

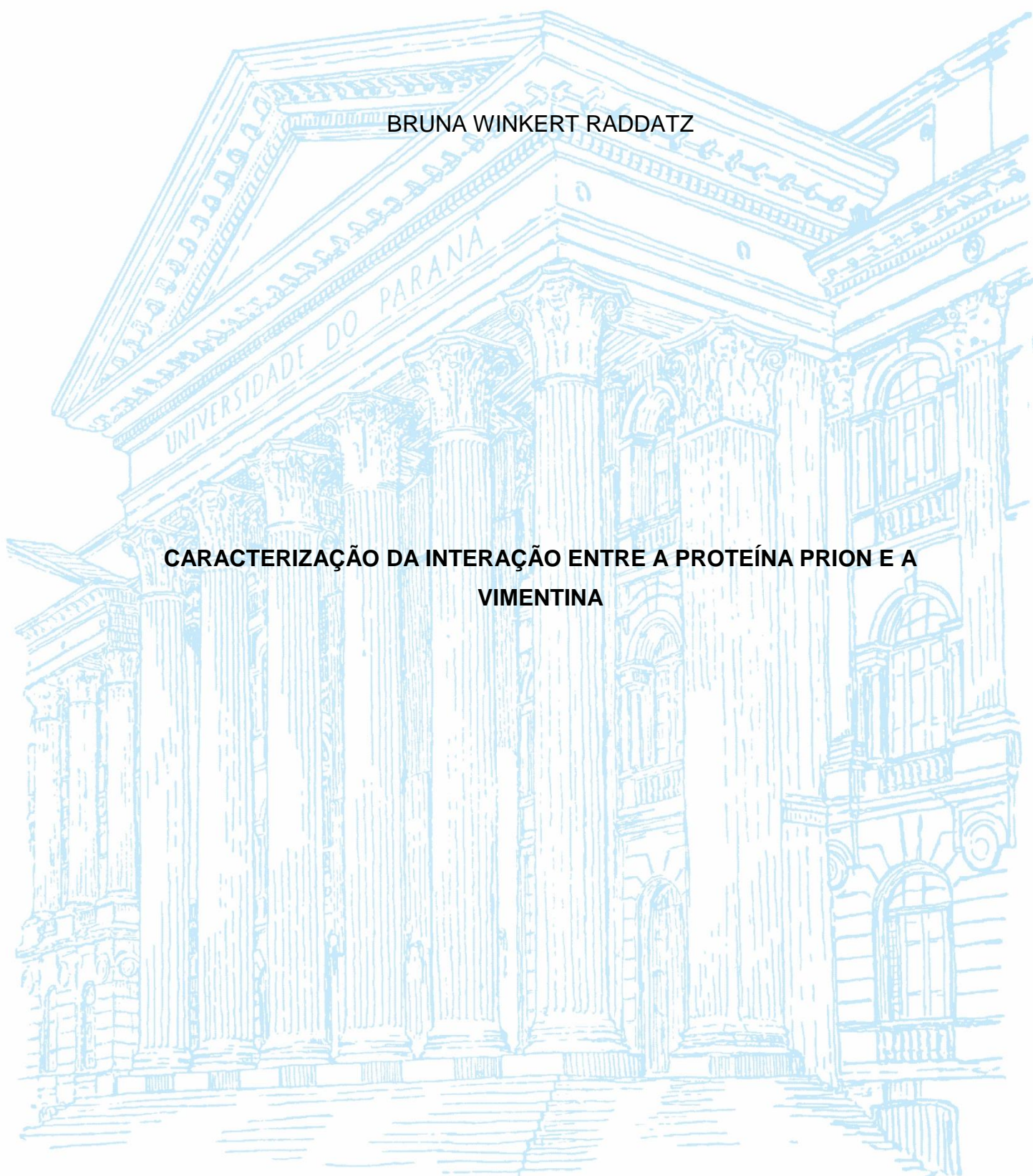
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA WINKERT RADDATZ

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA PRION E A
VIMENTINA**

CURITIBA

2017



BRUNA WINKERT RADDATZ

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE A PROTEÍNA PRION E A
VIMENTINA**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof^a Dra. Adriana Frolich Mercadante
Co-orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Raddatz, Bruna Winkert
Caracterização da interação entre a proteína prion e a vimentina. /
Bruna Winkert Raddatz. – Curitiba, 2017.
99 f. ; 30cm.

Orientador: Profª Dra. Adriana Frolich Mercadante
Co-orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia.

1. Proteína prion celular. I. Título II. Mercadante, Adriana Frolich III.
Zanata, Silvio Marques IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia.

CDD (22. ed.) 579.29



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

“Caracterização da interação entre a proteína prion e a vimentina”

por

Bruna Winkert Raddatz

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:

Adriana F. Mercadante
Profa. Dra. Adriana Frohlich Mercadante – Presidente

Rubens Bertazzoli Filho
Prof. Dr. Rubens Bertazzoli Filho

Giselle Klassen
Profa. Dra. Giseli Klassen

Curitiba, 21 de março de 2017.

Dedico esse trabalho à minha avó, Balbina Mika Winkert, que não mais se encontra entre nós, mas que foi uma mulher pioneira em diversos aspectos, que sempre me inspirou e que continua fazendo-o até hoje no silêncio do meu coração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em maior instância, ao **Universo**, à **Física**, à **Química** e à **Biologia**, por se mostrarem sempre tão interessantes, tão famintos por terem seus segredos revelados e por terem me inspirado a trilhar meu caminho até aqui.

Aos meus pais, **Cláudio** e **Odilce** por tudo. Pela educação, pelos esforços não medidos para me dar sempre do melhor, pelo amor, pelo apoio incondicional, pelas lições de vida e por serem os melhores pais que eu poderia ter. Eu amo vocês.

Ao meu namorado **Arisson** por estar sempre disposto a ouvir meus lamentos, por me apoiar em todas as decisões que eu tomava, por ouvir sobre meus experimentos mesmo sem ter noção sobre o que se tratavam e por estar sempre ao meu lado. Eu amo você.

À minha orientadora e amiga **Adriana F. Mercadante**, por ser um dos melhores exemplos de cientista, pessoa e mulher que eu poderia ter. Por sempre ter um tempo para me ouvir e me ajudar, mesmo estando ocupada, e por sempre guiar meus pensamentos e trabalhos com uma sutileza e conhecimento admiráveis.

Aos orientadores **Silvio M. Zanata** e **Lia S. Nakao**, pelas discussões e observações sempre bem pontuadas, que muitas vezes me ajudaram e me deram uma diferente perspectiva das coisas.

Ao professor **Edvaldo Silva Trindade** pelo auxílio essencial nos experimentos de imunofluorescência, sem seus conselhos eu jamais teria conseguido os resultados que consegui.

Ao técnico **Israel Bini**, pelas incontáveis horas no microscópio confocal, que me ensinaram um pouco mais sobre microscopia e imunofluorescência.

Aos meus amigos de **Nathly**, **Larissa**, **Sze**, **Susumu**, **Carla** e **Camila** pelas conversas agradáveis na hora do almoço, pelas risadas, pelas discussões e por tornarem os meus dias no laboratório muito mais divertidos.

Aos demais **colegas do Laboratório de Neurobiologia** por participarem ativamente do meu dia-a-dia, ajudando-me em experimentos, ensinando-me técnicas novas e debatendo assuntos fúteis nos tempos livres.

À **Universidade Federal do Paraná**, ao **Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia**, e à **CAPES** pela oportunidade de mestrado e pela bolsa de estudos.

A todos que direta ou indiretamente estiveram envolvidos na execução deste trabalho.

**“Nós chegamos no mundo sozinhos,
e vamos embora da mesma forma.
O tempo que gastamos entre esses eventos,
o tempo que gastamos vivos,
compartilhando e aprendendo juntos
é o que faz a vida valer a pena.”**

Jean Grey

RESUMO

A proteína prion celular, ou PrP^C, é uma proteína ancorada externamente à membrana plasmática por uma molécula de glicofosfatidilinositol. Sua conversão de uma forma fisiológica para uma isoforma mal dobrada e infecciosa, denominada *scrapie*, é responsável pelo aparecimento das doenças priônicas, também conhecidas como Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis. Para elucidar as funções fisiológicas de PrP^C, são realizados estudos para se descobrir seus possíveis parceiros moleculares. Recentemente, resultados obtidos por nosso grupo identificaram dez possíveis ligantes para PrP^C, dentre os quais destaca-se a vimentina, uma proteína de filamento intermediário. Em células com quantidade excessiva de proteína mal dobrada ou com inibição de proteassoma, há a formação de agressomos, estruturas pericentriolares com agregados de proteínas em seu centro e envoltos por uma gaiola de filamentos intermediários compostos principalmente por vimentina. Para esmiuçar a relação entre as proteínas PrP^C e vimentina, verificar a formação de agressomos e suas possíveis consequências para as células, fizemos experimentos de *Pull-Down*, imunofluorescência, *Western Blot*, solubilidade em metanol e MTT em células HeLa e N2a. Foram testados tratamentos com DMSO, MG132 e Ciclosporina A (CsA), e transfecções com plasmídeos expressando GFP, GFP-PrP^C, GFP-PrP^{Cy}, e mutantes de PrP^C P104L e V179I. A interação entre as proteínas prion celular e vimentina pôde ser confirmada *in vitro* pela técnica de *Pull-Down* nas células HeLa. Inesperadamente, a viabilidade celular de HeLa e N2a não pareceu ser afetada por nenhum dos tratamentos testados. Nas imunofluorescências com ambas as células foi possível observar a formação de agressomos, principalmente nos tratamentos com MG132 e CsA, sendo o primeiro um inibidor de proteassoma e o segundo um inibidor da via das ciclofilinas. A formação desses agressomos parece estar ligada a uma redução na expressão de vimentina de ambas as células, e a um aumento da insolubilidade da proteína prion nas células N2a, mas não nas células HeLa.

Palavras chave: Prion. Vimentina. Agressomos. *Scrapie*.

ABSTRACT

The cellular prion protein, or PrP^C, is a protein anchored to the external leaflet of the plasma membrana by a glycoposphatidylinositol molecule. Its conversion from a physiological isoform to a misfolded and infeccious one, named scrapie, is responsible for the prionic diseases, also known as Transmissible Spongiform Encephalopathies. To elucidate the physiological functions of PrP^C, studies are conducted to discover its possible molecular partners. Recently, studies done by our group found ten possible ligants for PrP^C, among of them is the vimentin, a intermediate filament protein. In cells showing high levels of misfolded proteins or with proteasome inhibition, there is the formation of aggresomes, pericentriolar structures with protein aggregates on its center wrapped by a cage of intermediate filaments composed mostly by vimentin. To deeply investigate the relation between PrP^C and vimentin proteins, to verify the formation of aggresomes and its possible consequences to the cells, we did Pull-Down, immunofluorescence, Western Blot, methanol solubility and MTT experiments in HeLa and N2a cells. We tested treatments with DMSO, MG132 and Cyclosporine A (CsA), and transfections with plasmids expressing GFP, GFP-PrP^C, GFP-PrP^{Cy}, and PrP^C mutants P104L and V179I. The interaction between cellular prion protein and vimentin could be confirmed in vitro by the Pull-Down technique in HeLa cells. Unexpectedly, the HeLa and N2a cell viability was not affected by none of the tested treatments. Immunofluorescence with both cells showed the formation of aggresomes, mainly in MG132 and CsA treatments, the first being a proteasome inhibitor and the second a cyclophilins route inhibitor. The formation of these aggresomes seems to be linked to a reduction in vimentin expression in both cells, and to an increase in insolubility of prion protein in N2a cells, but not in HeLa cells.

Keywords: Prion. Vimentin. Aggresomes. Scrapie.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	– ESTRUTURA DO PRP ^C HUMANO.....	20
FIGURA 2	– ESTRUTURAS DE PRP ^C E PRP ^{Sc}	22
FIGURA 3	– POLIMORFISMOS DO GENE <i>PRNP</i> E SUAS ASSOCIAÇÕES COM DOENÇAS PRIÔNICAS CONHECIDAS EM HUMANOS.....	23
FIGURA 4	– AGRESSOMO EM CÉLULA HEK293T.....	30
FIGURA 5	– MECANISMO DE AÇÃO DO MG132 NO PROTEASSOMA.....	35
FIGURA 6	– INTERAÇÃO ENTRE VIMENTINA E PRP ^C OBTIDA PELA TÉCNICA DE <i>PULL-DOWN</i>	43
FIGURA 7	– PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULAS HELA COM METANOL 100% POR 15 MINUTOS.....	45
FIGURA 8	– PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULAS HELA COM METANOL 100% NOS TEMPOS DE 1 A 6 MINUTOS.....	46
FIGURA 9	– PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULAS HELA COM TRITON X-100 NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1% E 0,05%.....	48
FIGURA 10	– PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULAS HELA COM TRITON X-100 POR 10 MINUTOS NAS CONCENTRAÇÕES 0,05%, 0,1% E 0,25%.....	49
FIGURA 11	– PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULA HELA COM SAPONINA 0,01% POR 60 MINUTOS.....	50
FIGURA 12	– PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULAS HELA COM SAPONINA EM TEMPO DE 5 A 15 MINUTOS.....	51
FIGURA 13	– PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULAS HELA COM SAPONINA EM PBS DE 1 A 10 MINUTOS.....	53
FIGURA 14	– COMPARAÇÃO ENTRE AS PERMEABILIZAÇÕES COM SAPONINA SOMENTE EM PBS E SAPONINA EM PBS COM BSA.....	54
FIGURA 15	– EXPERIMENTOS COM CÉLULAS HELA PARA CERTIFICAR A CORRETA MARCAÇÃO DE PRP.....	56
FIGURA 16	– HELA TRANSFECTADA COM GFP E TRATADA COM DMSO, MG132 OU CSA.....	58
FIGURA 17	– CÉLULAS HELA TRANSFECTADAS COM GFP-PRP ^C E TRATADAS COM DMSO, MG132 OU CSA.....	60
FIGURA 18	– CÉLULAS HELA TRANSFECTADAS COM PRPCY E TRATADAS COM DMSO, MG132 OU CSA.....	62

FIGURA 19	– HELA TRANSFECTADA COM PRP ^C P104L E V179I.....	64
FIGURA 20	– CÉLULAS N2A NÃO TRANSFECTADAS E TRATADAS COM DMSO, MG132 OU CSA.....	65
FIGURA 21	– CÉLULAS N2A TRANSFECTADAS COM GFP E TRATADAS COM DMSO, MG132 OU CSA.....	67
FIGURA 22	– CÉLULAS N2A TRANSFECTADAS COM PRP ^C E TRATADAS COM DMSO, MG132 OU CSA.....	69
FIGURA 23	– CÉLULAS N2A TRANSFECTADAS COM PRPCY E TRATADAS COM DMSO, MG132 OU CSA.....	70
FIGURA 24	– N2A TRANSFECTADAS COM PRP ^C MUTADOS EM P104L E V179I E TRATADAS COM CSA.....	71
FIGURA 25	– <i>WESTERN BLOTS</i> COM ANTICORPOS ANTI-VIMENTINA E ANTI-VINCULINA EM CÉLULAS HELA.....	73
FIGURA 26	– DENSITOMETRIA DOS <i>WESTERN BLOTS</i> DE CÉLULA HELA.....	74
FIGURA 27	– <i>WESTERN BLOTS</i> COM ANTICORPOS ANTI-VIMENTINA E ANTI-VINCULINA EM CÉLULAS N2A.....	76
FIGURA 28	– DENSITOMETRIA DOS <i>WESTERN BLOTS</i> DE CÉLULAS N2A.....	77
FIGURA 29	– VIABILIDADE CELULAR EM HELA.....	79
FIGURA 30	– VIABILIDADE CELULAR EM N2A.....	79
FIGURA 31	– PRECIPITAÇÃO DE PRP COM METANOL EM CÉLULAS HELA....	80
FIGURA 32	– PRECIPITAÇÃO DE PRP COM METANOL EM CÉLULAS N2A.....	82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– COMPARAÇÃO ENTRE AS LINHAGENS CELULARES UTILIZADAS.....	32
TABELA 2	– CONDIÇÕES DE PERMEABILIZAÇÃO USADAS PARA A IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	39
TABELA 3	– RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA, EXPRESSÃO DE VIMENTINA E SOLUBILIDADE EM METANOL.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6His	– Tag com 6 aminoácidos histidina em série
CJD	– <i>Creutzfeldt-Jacob Disease</i> ou Doença de Creutzfeldt-Jacob
iCJD	– Doença de Creutzfeldt-Jacob iatrogênica
vCJD	– Doença de Creutzfeldt-Jacob variante
BSA	– <i>Bovine Serum Albumin</i> ou Albumina Sérica Bovina
BSE	– <i>Bovine Spongiform Encephalopathy</i> ou Encefalopatia Espongiforme Bovina
CsA	– Ciclosporina A
DAPI	– 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	– <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DNA	– Ácido Desoxirribonucléico
ERAD	– <i>Endoplasmic Reticulum Associated Degradation</i> ou Degradação Associada ao Retículo Endoplasmático
pERK	– <i>Phosphorylated Extracellular Signal-Regulated Kinase</i> ou Quinase regulada por sinal extracelular fosforilada
FFI	– <i>Fatal Familial Insomnia</i> ou Insônia Familiar Fatal
GFAP	– <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> ou Proteína Ácida Fibrilar Glial
GFP	– <i>Green Fluorescent Protein</i> ou Proteína Verde Fluorescente
GPI	– Glicofosfatidilinositol
GSS	– Síndrome de <i>Gerstmann–Sträussler–Scheinker</i>
ICAM-1	– <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> ou Molécula de Adesão Intercelular 1
IGF1R	– <i>Insulin-like Growth Factor 1 Receptor</i> ou Receptor de fator de crescimento semelhante à insulina 1
IgG	– Imunoglobulina isotipo G
MAP	– <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> ou Proteína-Quinase Ativada por Mitógeno
MG132	– Peptídeo aldeído carbobenzoxil-L-leucil-L-leucil-L-leucinal
MTT	– Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NEM	– <i>N-Ethylmaleimide</i> ou N-Etilmaleimida
NP40	– Detergente Tipo Tergitol NP40 ou Nonil-fenoxi-polietoxi-etanol
NT	– Célula não transfectada

P	– <i>Pellets</i>
Page	– <i>Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> ou Gel de Eletroforese de Poliacrilamida
PBS	– Tampão Fosfato Salino
PKC ϵ	– Proteína Quinase C tipo ϵ
PMSF	– <i>Phenylmethanesulfonyl Fluoride</i> ou Fluoreto de fenilmetanosulfonil
PrP	– Designação geral da proteína prion
PrP ^C	– Proteína prion celular
PrP ^{Sc}	– Isoforma <i>scrapie</i>
PrP ^{Cy}	– Forma citosólica da proteína prion
PVDF	– Fluoreto de Polivinilideno
RE	– Retículo Endoplasmático
RNA	– Ácido Ribonucléico
mRNA	– RNA mensageiro
S	– Sobrenadantes
SDS	– Dodecil Sulfato de Sódio
PAGE	– <i>Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> ou Gel de Eletroforese de Poliacrilamida
SFB	– Soro Fetal Bovino
VCAM-1	– <i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i> ou Molécula de Adesão de Célula Vascular 1
TBST	– Tampão Salino de Tris com Tween 20
Tris	– Tri(hidroximetil)aminometano
TSE	– <i>Transmissible Spongiform Encephalopathies</i> ou Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis

LISTA DE SÍMBOLOS

- α – Letra grega alfa
- β – Letra grega beta
- ε – Letra grega épsilon
- ζ – Letra grega zeta
- ® – Marca registrada
- ™ – *Trademark*, não necessariamente registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 PROTEÍNA PRION.....	20
3.2 VIMENTINA.....	25
3.3 AGRESSOMOS	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 LINHAGENS CELULARES	32
4.2 CULTIVO CELULAR	32
4.3 TRANSFEÇÃO E PLASMÍDEOS.....	33
4.4 ANTICORPOS.....	34
4.5 TRATAMENTOS CELULARES UTILIZADOS	34
4.6 <i>WESTERN BLOT</i>	36
4.7 <i>PULL-DOWN</i>	36
4.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA	38
4.8.1 Padronização da permeabilização	38
4.8.2 Padronização da marcação de PrP ^C	39
4.8.3 Células e tratamentos na imunofluorescência.....	40
4.9 QUANTIFICAÇÃO DA VIMENTINA SOB DIVERSOS TRATAMENTOS.....	40
4.10 ENSAIO DE MORTE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT	41
4.11 SOLUBILIDADE DE PRP ^C COM METANOL.....	42
5 RESULTADOS.....	43
5.1 <i>PULL-DOWN</i>	43
5.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA	44
5.2.1 Padronização da permeabilização	44
5.2.1.1 Metanol.....	44
5.2.1.2 Triton X-100.....	47
5.2.1.3 Saponina	49
5.2.2 Padronização da marcação de PrP ^C	54
5.2.3 Imunofluorescência de células HeLa.....	57

5.2.4 Imunofluorescência de células N2a.....	64
5.3 QUANTIFICAÇÃO DA VIMENTINA SOB DIVERSOS TRATAMENTOS.....	72
5.4 ENSAIO DE MORTE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT	78
5.5 SOLUBILIDADE DE PRP ^C COM METANOL.....	80
6 DISCUSSÃO	84
7 CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS.....	93
APÊNDICE 1	98
APÊNDICE 2.....	99

1 INTRODUÇÃO

A proteína prion celular, ou PrP^C, é uma proteína ancorada externamente à membrana plasmática expressa em grandes quantidades no sistema nervoso central (BENDHEIM et al., 1992). Sua estrutura normal é predominantemente em α -hélices (PAN et al., 1993 apud PRUSINER et al., 1998), mas é possível que aconteça seu redobramento para uma isoforma de estrutura folha- β , denominada *scrapie* (PrP^{Sc}). Esta última isoforma compõe os prions (*proteinaceous infectious particle*), partículas infecciosas, responsáveis pelas Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (TSEs), também denominadas proteopatias (do inglês *proteopathies*). São doenças caracterizadas pela neurodegeneração e agregação proteica e, embora tenham baixa prevalência, são invariavelmente fatais.

Na tentativa de entender um pouco mais sobre as TSEs, buscou-se saber qual era o papel fisiológico de PrP^C. Embora ainda não se tenha chegado a um consenso sobre sua função, estudos sugerem que ela esteja envolvida em complexos multiproteicos, desempenhando funções diferentes de acordo com a interação realizada (revisado por LINDEN et al., 2008; MARTINS et al., 2010). Experimentos de duplo-híbrido em levedura realizados anteriormente no laboratório de Neurobiologia da Universidade Federal do Paraná evidenciaram dez possíveis ligantes para PrP^C, dentre os quais destaca-se a proteína vimentina (GIMÉNEZ et al., 2015).

Vimentina é uma proteína de filamento intermediário com cerca de 465 resíduos de aminoácidos e 58 kDa, sendo expressa predominantemente em células mesenquimais (KRISTIANSEN et al., 2005; COLUCCI-GUYON et al., 1994). Ela está envolvida em uma série de processos celulares, incluindo adesão, migração, sinalização e regulação dos ciclos celulares (revisado por IVASKA et al., 2007).

Normalmente, a via canônica de PrP^C inclui sua degradação por via lisossomal. No caso de PrP^C ser mal dobrado, ele pode ser redirecionado para marcação com ubiquitina e degradação pelo proteassoma (SHAO et al., 2014). Todavia, quando a capacidade de degradação de proteína mal dobrada é excedida, ou na presença de inibidores de proteassoma, PrP mal dobrado se acumula em estruturas denominadas agressomos (JOHNSTON, WARD E KOPITO, 1998; KRISTIANSEN et al., 2005).

Agressomos são inclusões citoplasmáticas contendo proteína mal dobrada que é envolta por uma gaiola de filamentos intermediários. Trata-se de uma resposta celular geral à proteína mal dobrada, e serve para estabilizar e restringir a

disseminação das partículas de proteínas agregadas (JOHNSNTON, WARD E KOPITO, 1998). A vimentina se apresenta como o principal filamento intermediário dos agressomos (JOHNSTON, WARD E KOPITO, 1998; CORCHERO, 2016).

Embora tais agregados de PrP não aparentem ser tóxicos para a célula (KRISTIANSEN et al., 2005), eles apresentam características que lembram a isoforma *scrapie*, como por exemplo a insolubilidade a detergentes e a resistência à proteólise por proteinase K (COHEN e TARABOULOS, 2003).

No presente estudo, procuramos aprofundar os conhecimentos sobre agressomos e detalhar as interações entre as proteínas prion e vimentina, de modo a elucidar seus efeitos na célula. Acreditamos que ao entender melhor o fenômeno dos agressomos, seja possível também aplicar tais conhecimentos a outras proteopatias, como a doença de Alzheimer e de Parkinson, além criar tratamentos diferenciados e específicos para as TSEs.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Caracterizar a interação entre a proteína prion celular e a vimentina, em células de alta expressão de vimentina e em células neuronais, e condições de superexpressão das várias formas da proteína prion. Verificar se essa interação pode estar envolvida na conversão de PrP^C para uma isoforma mais tóxica, e se essa conversão pode estar associada a uma maior taxa de morte celular, a alterações no citoesqueleto das células, formação de agressomos e à mudança na solubilidade de proteína prion.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

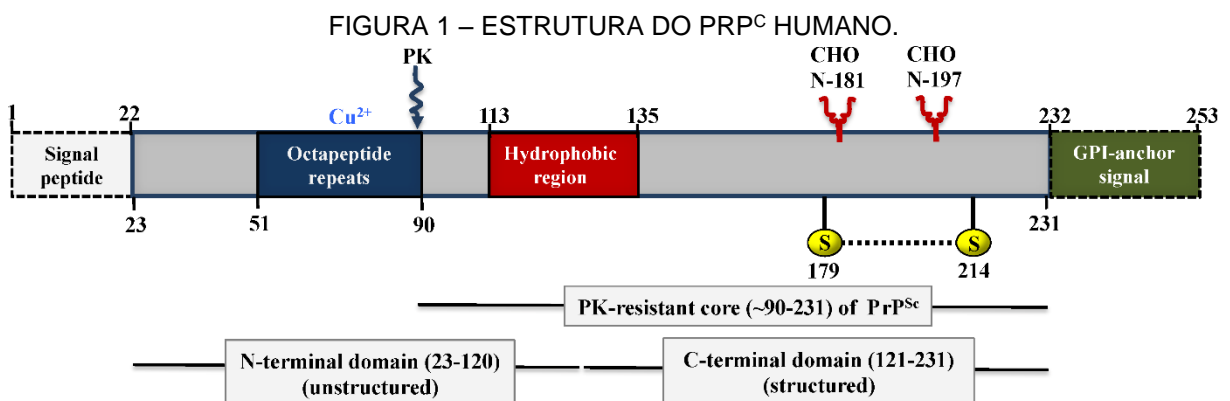
- Confirmar se as proteínas PrP^C e vimentina realmente interagem em modelo *in vitro*;
- Evidenciar a localização celular de ambas as proteínas em célula expressando altas quantidades de vimentina (HeLa) e em célula neuronal (N2a), em contexto de inibição de proteassoma e de estresse celular por proteína mal dobrada, para saber se as proteínas podem co-localizar;
- Verificar alterações no citoesqueleto e formação de agressomos em relação à diferentes quantidades e espécies da proteína prion, incluindo formas associadas a doenças priônicas;
- Verificar se há alteração na solubilidade da proteína prion quando há a formação de agressomos;
- Determinar a viabilidade das células HeLa e N2a sob os tratamentos celulares e condições testados nos experimentos de imunofluorescência.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PROTEÍNA PRION

A proteína prion celular, ou PrP^C, é uma proteína ancorada externamente à membrana plasmática por uma molécula de glicofosfatidilinositol (GPI), podendo ser mono, di, ou não glicosilada. É expressa na maioria dos tecidos sendo mais abundante no sistema nervoso central (BENDHEIM et al., 1992). Trata-se de uma proteína altamente conservada em mamíferos e parálogos, tendo sido encontrada em répteis, anfíbios e peixes (revisado por HEIKENWALDER, JULIUS E AGUZZI, 2007).

A estrutura do PrP^C humano, mostrada abaixo na FIGURA 1, é composta por um peptídeo sinal de endereçamento para o retículo endopasmático (RE) em seu N-terminal, uma sequência sinal para a inserção de uma molécula de GPI em seu C-terminal, dois possíveis sítios de N-glicosilação nas asparaginas 181 e 197 e um sítio para ponte dissulfeto entre as cisteínas 179 e 214. Sua forma não processada apresenta 253 aminoácidos, enquanto sua forma madura possui entre 208-209 aminoácidos e aproximadamente 35 kDa (ACEVEDO-MORANTES E WILLE, 2014; LINDEN et al., 2008).



FONTE: ACEVEDO-MORANTES E WILLE, 2014.

Como uma glicoproteína de membrana típica, durante sua biossíntese, PrP (nome que usaremos para designar as formas da proteína prion de uma maneira generalizada) nascente passa pelo retículo endoplasmático, onde é processado e glicosilado antes de receber sua âncora de GPI, para depois ser dobrado e transportado para o Golgi. Neste, o PrP recebe diversas modificações adicionais em seus glicanos, sendo então transportado para a superfície da célula, e só nesse

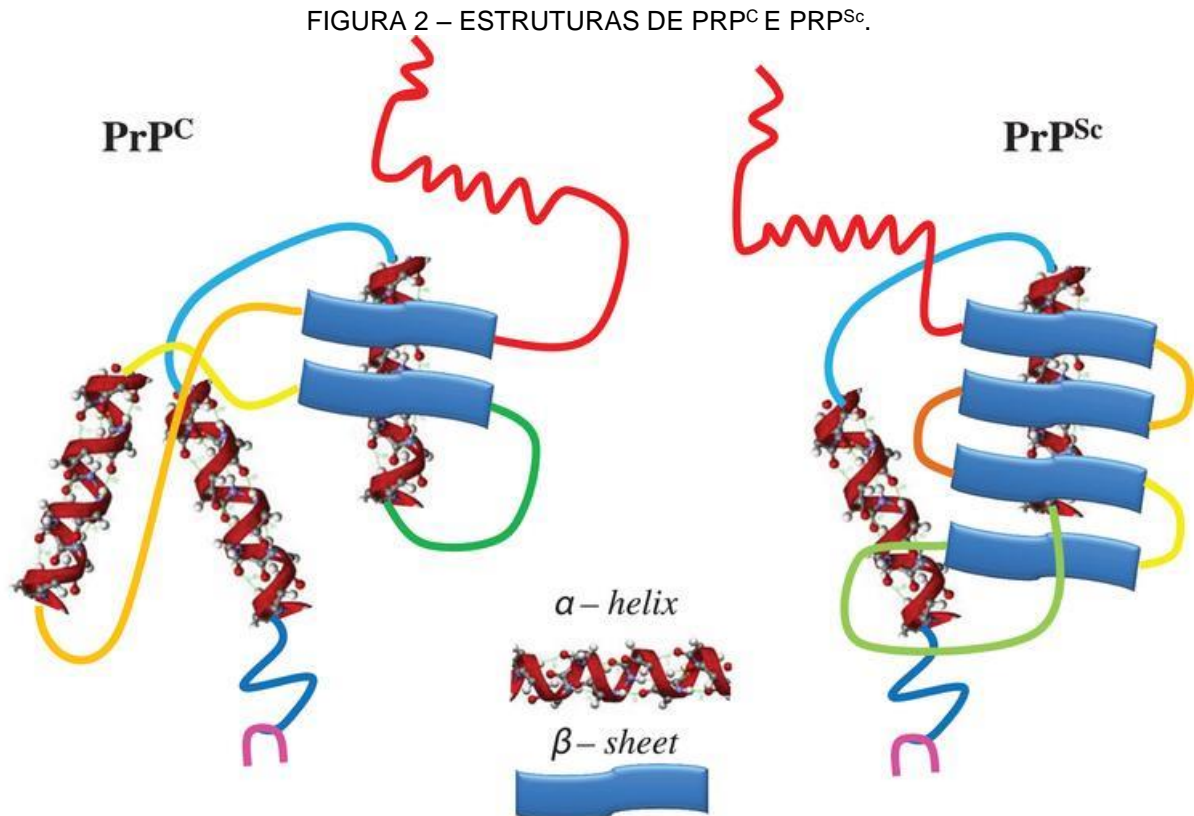
momento passa a ser denominado PrP^C (revisado por CHAKRABARTI, ASHOK E HEDGE, 2009).

Este PrP^C maduro e de membrana pode ser endocitado para compartimentos endossomais, a partir de onde pode seguir para duas rotas distintas: ser reciclado, voltando para a superfície celular, ou ser direcionado para os lisossomos para degradação. A maior parte do PrP^C de uma célula segue pela via lisossomal de degradação. Todavia, devido à baixa efetividade de seu peptídeo sinal durante a translocação do PrP nascente para o retículo, uma parte de sua população (variando até valores acima de 50% da quantidade total de proteína prion na célula) pode permanecer presa no citosol, gerando o que chamaremos de PrP_{cy} (proteína prion citosólica), ou ser parcialmente translocada na membrana do retículo endoplasmático, gerando as formas transmembrânicas de PrP (revisado por CHAKRABARTI, ASHOK E HEDGE, 2009).

As formas de PrPs que não passam no controle de qualidade do retículo endoplasmático, como quando são mal-dobradas, por exemplo, são deglicosiladas e removidas deste por retrotranslocação de volta para o citosol celular, onde serão degradadas pelo sistema ubiquitina-proteassoma, um componente do sistema de Degradação Associado ao Retículo Endoplasmático (ERAD) (HOMMA et al., 2015). O PrP mal-dobrado e retrotranslocado é então adicionado de moléculas de ubiquitina, que farão o papel de marcá-lo para a degradação via proteassoma 26S em eucariotos (SHAO et al., 2014).

A estrutura normal de PrP^C é composta predominantemente de regiões helicoidais e α -hélices (PAN et al., 1993 apud PRUSINER et al., 1998). Seu redobramento para uma isoforma que possui estrutura de folha- β , denominada *scrapie* (PrP^{Sc}), é acompanhada por mudanças profundas nas propriedades físico-químicas do PrP, tornando-se insolúvel a detergentes não-desnaturantes e resistente à digestão por proteinase K (OESCH et al., 1985 apud PRUSINER et al., 1998). A mudança de uma conformação em α -hélice para uma conformação em folha- β também explica a tendência de PrP^{Sc} a se compactar, formando agregados proteicos (revisado por LINDEN et al., 2008). Apesar de vários modelos terem sido propostos para a formação dos agregados de PrP^{Sc}, o mais aceito atualmente é que PrP^{Sc} dobra-se de maneira a permitir sua interação com PrP^C, produzindo mais moléculas de si mesmo, e após várias etapas dessa transformação com concomitante produção de PrP^C pela célula, há o acúmulo da forma *scrapie* (revisado por CHAKRABARTI, ASHOK E HEDGE,

2009; LINDEN et al., 2008). Essa isoforma alterada compõe quase que exclusivamente os prions (*proteinaceous infectious particle*), partículas infecciosas transmissíveis, responsáveis pelas Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (TSEs). A FIGURA 2 ilustra as formas normal e patogênica de PrP.

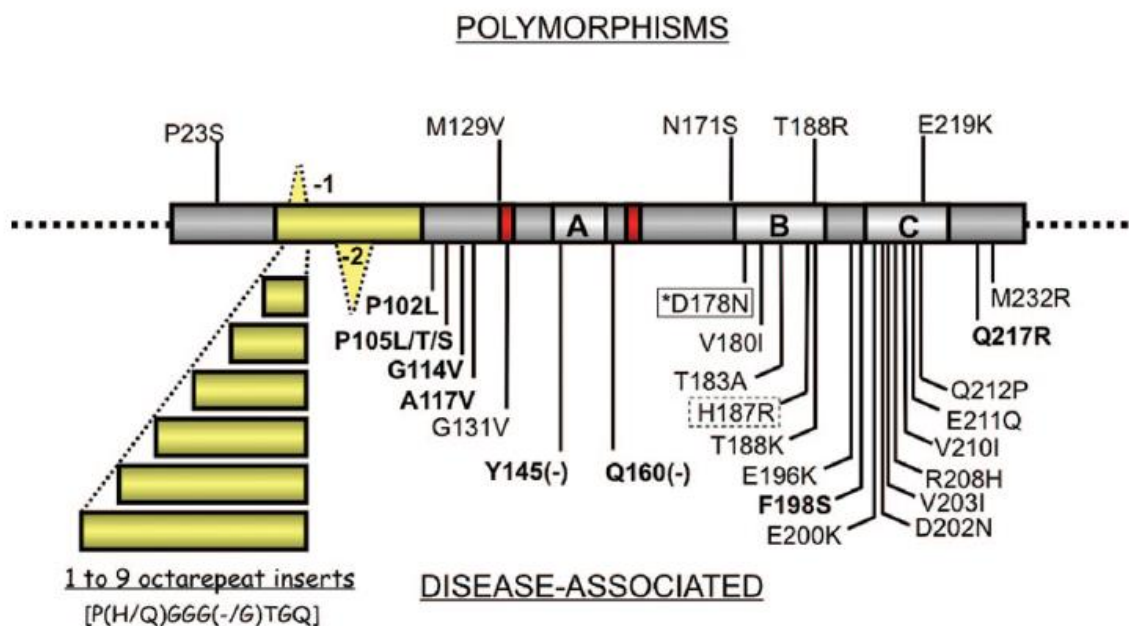


FONTE: ADAM, et al., 2015.

As TSEs são doenças caracterizadas pela neurodegeneração e agregação proteica que afetam tanto humanos quanto animais como bovinos e ovelhas. Essas doenças atingem grupos de diferentes idades, causando uma variedade de sintomas motores e cognitivos, e embora tenham pouca prevalência, são ainda incuráveis e invariavelmente fatais (BOLTON et al., 1982; LINDEN et al., 2008). As TSEs podem ocorrer na forma familiar, oriundas de mutações passadas de geração em geração, como é o caso da Doença de Creutzfeldt-Jacob (CJD), da Insônia Familiar Fatal (FFI) e da Doença de Gerstmann–Sträussler–Scheinker (GSS) em humanos; na forma adquirida, através da ingestão da forma infectante PrP^{Sc}, como na Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE), Kuru, Doença de Creutzfeldt-Jacob iatrogênica e variante (iCJD e vCJD, respectivamente); ou na forma esporádica (HEAD et al., 2004).

Embora a maioria dos casos da doença ocorram a partir da forma esporádica, cerca de 10-15% desses casos podem ser atribuídos à presença de uma mutação autossomal dominante no gene *PRNP*. A mudança de um único par de bases, ou a inserção de segmentos repetitivos em seu DNA, formam a conhecida sequência de alterações do gene *PRNP* associada com doenças priônicas de caráter genético (revisado por MATRIANNI, 2010). A FIGURA 3, mostra alguns polimorfismos do gene *PRNP* e as doenças priônicas correspondentes.

FIGURA 3 – POLIMORFISMOS DO GENE *PRNP* E SUAS ASSOCIAÇÕES COM DOENÇAS PRIÔNICAS CONHECIDAS EM HUMANOS.



As mutações em negrito são associadas à GSS, a mutação em caixa sólida é associada à CJD ou à FFI (dependendo do genótipo do códon 129), as mutações em caixa pontilhada são associadas ao fenótipo de CJD mas com patologia variante, e as demais mutações são associadas ao fenótipo comum de CJD. FONTE: MATRIANNI, 2010.

Logo após a descoberta do prion, acreditava-se que ele era o cerne da degeneração que ocorria nas TSEs, e que a toxicidade observada se daria a um possível ganho de função ao se converter PrP^{C} para PrP^{Sc} . Apesar de em casos de infecção por *scrapie* ocorrer intenso acúmulo de PrP^{Sc} na célula, e ele se inoculado em outra célula *in vivo* ou *in vitro*, causar sua morte, este fato somente parece não explicar a neurodegeneração que é observada (revisado por CHAKRABARTI, ASHOK E HEDGE, 2009). Uma análise sistemática de pacientes falecidos em decorrência da doença mostra que não há correlação espacial entre a neurodegeneração e os depósitos de PrP^{Sc} (revisado por LINDEN et al., 2008). De fato, atualmente sabe-se

que o PrP^{Sc} por si só não é tóxico para as células, se estas não expressarem PrP^C (revisado por CHAKRABARTI, ASHOK E HEDGE, 2009). Estudos realizados em camundongos nocaute, nos quais o gene *PRNP* foi removido, demonstraram que esses animais são resistentes às doenças causadas por prions (BÜELER et al., 1992; BÜELER et al., 1993). Além disso, várias doenças priônicas familiares raras causadas por mutações no gene *PRNP* não são transmissíveis e causam pouco ou nenhum acúmulo de PrP^{Sc} (revisado por CHAKRABARTI, ASHOK E HEDGE, 2009). Isso nos leva a duvidar da hipótese de que a forma *scrapie* seja unicamente a causadora da neurodegeneração observada nas TSEs.

Uma segunda hipótese para a toxicidade observada seria o aumento das formas citosólicas de PrP. Estudos apontam que a expressão de formas citosólicas ou formas de PrP sem a âncora de GPI, em conjunto com a expressão de PrP^C *wild-type* produz acelerados efeitos clínicos que se assemelham aos das doenças causadas por PrP^{Sc} (CHESEBRO et al., 2005 apud ZAFAR et al. 2014). Corroborando, o trabalho de Ma, Wollmann e Lindquist (2002), aponta que a expressão de mutantes de PrP sem o peptídeo sinal de endereçamento para o retículo causa degeneração cerebral atípica em camundongos. Embora os níveis fisiológicos de PrP citosólicos (PrP_{cy}) sejam baixos, devido à atividade de degradação proteassomal, um acúmulo acima do normal pode ser capaz de ativar uma toxicidade celular (revisado por CHAKRABARTI, ASHOK E HEDGE, 2009). Condições que favoreçam o mal-dobramento de PrP, como mutações somáticas e/ou baixa função do proteassoma podem levar ao acúmulo de suas isoformas alteradas e possível neurotoxicidade (RESELLI et al., 2010).

Tendo em vista que as hipóteses do ganho de função de PrP^{Sc} e a toxicidade de formas citosólicas de PrP ainda não possam ser satisfatoriamente comprovadas, uma terceira hipótese é a de perda da função de PrP^C, uma vez que PrP^{Sc} se propaga através da depleção do primeiro (revisado por LINDEN et al., 2008). Todavia, ainda não se chegou a um consenso sobre a função fisiológica de PrP^C (revisado por LINDEN et al., 2008; MARTINS et al., 2010). Estudos realizados com camundongos nocaute para o gene *PRNP* demonstraram que esses desenvolvem-se normalmente, sem maiores alterações fenotípicas ou comportamentais (BÜELLER et al., 1992). Entretanto, parece pouco provável que a proteína PrP^C, sendo altamente conservada entre as espécies, tenha evoluído apenas para permitir o desenvolvimento de doenças fatais, e, realmente, novas funções têm sido atribuídas à proteína (revisado por

LINDEN et al., 2008). Muitas destas funções, como correlação com estresse e comportamento, ciclo sono-vigília, memória, processos de neuritogênese e neuroproteção, adesão celular, foram elucidadas com a descoberta de ligantes de PrP^C. Esses achados sugerem que PrP^C está envolvido em complexos multiproteicos, não tendo uma única função específica, mas desempenhando funções diferentes, de acordo com a interação realizada (revisado por LINDEN et al., 2008; MARTINS et al., 2010).

Vários estudos foram capazes de identificar ligantes e proteínas capazes de interagir com PrP^C (ZAFAR et al., 2011; ZAFAR et al., 2014). Estudos de duplo-híbrido em levedura realizados em nosso grupo evidenciaram dez possíveis ligantes para PrP^C, que, com estudos mais aprofundados, podem ajudar a elucidar as funções celulares desta proteína. Dentre os possíveis ligantes descobertos, encontra-se a proteína vimentina (GIMÉNEZ et al., 2015), alvo do presente trabalho.

3.2 VIMENTINA

Vimentina é uma proteína de filamento intermediário de classe III (juntamente com as proteínas desmina, GFAP e periferina), com cerca de 465 resíduos de aminoácidos e 58 kDa. Ela normalmente se agrupa em homopolímeros, embora também possua a capacidade de formar heteropolímeros com outros filamentos intermediários de classes III ou IV (MENDEZ, KOJIMA E GOLDMAN, 2010). Trata-se de um filamento intermediário expresso predominantemente em células mesenquimais, onde é majoritário, demonstrando uma extensa distribuição citoplasmática (KRISTIANSEN et al., 2005; COLUCCI-GUYON et al., 1994).

Experimentos *in vitro* demonstraram que a maioria das linhagens celulares estabelecidas em cultivo (como por exemplo HeLa, HEK193T, ME-180, W138, SV80, BMGE, MDCK, BHK21, CHO, dentre outras) expressam vimentina, em conjunto com outros filamentos intermediários típicos do tecido *in vivo* (FRANKE et al., 1979). Ainda, a modulação da síntese de vimentina pode ser dependente dos contatos célula-célula ou célula-substrato (BEN-ZE'EV, 1984 apud COLUCCI-GUYON et al., 1994).

A vimentina também é expressa em células que estão em estágio exponencial de crescimento (COLUCCI-GUYON et al., 1994), sendo assim utilizada como marcador de desenvolvimento de células e tecidos (revisado por IVASKA et al., 2007), ou mesmo como marcador de cânceres com potencial invasivo (MENDEZ, KOJIMA E

GOLDMAN, 2010). Além disso, a diferenciação celular e expressão de vimentina não altera as propriedades ou a expressão dos demais filamentos intermediários (MENDEZ, KOJIMA E GOLDMAN, 2010).

Um fato curioso sobre a vimentina é que durante muito tempo, não se soube qual era de fato a sua função na célula, pois os experimentos mostravam sempre resultados inconclusivos. A injeção de anticorpos anti-vimentina em células que a expressavam demonstrava o colapso da rede de filamentos, mas nenhuma alteração era vista na fisiologia da célula (KLYMKOWSKY, 1981; LIN E FERAMISCO, 1981 apud COLUCCI-GUYON et al., 1994). Segundo o trabalho de Colucci-Guyon et al. (1994), camundongos nocaute para o gene que expressa vimentina eram capazes de se desenvolverem e de se reproduzirem sem demonstrar um fenótipo anômalo. Os tecidos que normalmente expressam vimentina em grandes quantidades (cristalino, coração e baço) foram analisados e não foram detectadas diferenças histológicas entre os camundongos *wild type* e nocaute. Outras características como crescimento de pelos, cicatrização de ferimentos e diferenciação do cristalino também não apresentaram resultados significativamente diferentes dos do grupo controle. Outro detalhe que os autores perceberam foi a não existência de compensação da ausência de vimentina pela superexpressão de outra proteína do filamento intermediário. Esses resultados tornaram obscuras as possíveis funções celulares da vimentina.

Entretanto, estudos mais direcionados foram capazes de demonstrar que os camundongos nocaute para vimentina apresentavam mudanças morfológicas nas células da glia; dificuldade na cicatrização de ferimentos maiores devido à incapacidade dos fibroblastos migrarem para o local lesado; diminuição da dilatação induzida por fluxo em artérias de resistência; e direcionamento alterado de linfócitos aos linfonodos. Estas alterações observadas não poderiam ser detectadas em uma observação superficial ou exame histológico de rotina, sendo necessárias medições de parâmetros fisiológicos altamente específicos e/ou submissão dos camundongos a condições de estresse (revisado por IVASKA et al., 2007).

A vimentina é uma proteína com domínios extremamente conservados entre diferentes espécies, sugerindo que ela possua função fisiológica importante. Dentre esses sítios conservados, encontram-se complexas zonas de fosforilação da proteína, sendo que cada uma dessas é modificada por enzimas diferentes, conferindo à vimentina uma série de funções celulares, dentre as quais se incluem: adesão,

migração, sinalização, regulação dos ciclos celulares (revisado por IVASKA et al., 2007).

A função da vimentina na adesão celular está intimamente ligada com sua interação com integrinas, receptores heterodímeros transmembrânicos, sendo observada especialmente na adesão célula-célula no endotélio, e em adesões célula-matriz extracelular. Nesses últimos casos, o citoesqueleto de vimentina apresenta função importante na modulação do tamanho e estabilidade das adesões focais, sendo fundamental para o reforço destas. Na ligação do endotélio à matriz, por exemplo, as adesões focais permitem que ele possa suportar alterações no fluxo sanguíneo e altas tensões de cisalhamento. Em camundongos nocaute para vimentina, em que tais reforços não estão presentes, há a liberação das células do endotélio sob condições de fluxo sanguíneo aumentado (revisado por IVASKA et al., 2007). Além disso, foi notada alteração na distribuição das adesões focais em fibroblastos (MENDEZ, KOJIMA E GOLDMAN, 2010).

A vimentina também está associada ao tráfego intracelular de vesículas, tal como foi relatado para o processo de reciclagem de integrinas, mediado pela fosforilação por PKC ϵ . Tal processo permite que as vesículas contendo integrinas endocitadas da membrana sejam ou recicladas novamente para a membrana, ou direcionadas para degradação (revisado por IVASKA et al., 2007). Embora a vimentina seja uma molécula intracelular, há relatos também indicando que ela pode ser secretada por macrófagos e astrócitos, ligando-se diretamente ao receptor de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1R) para induzir crescimento de axônios em cultura de neurônios corticais (SHIGYO et al., 2015).

Segundo revisado por Ivaska et al. (2007), Mendez, Kojima e Goldman (2010) e Byun et al. (2001), outras funções celulares desempenhadas pela vimentina incluem:

- Adesão e transmigração de leucócitos no endotélio, pela indução de moléculas de adesão, como ICAM-1 e VCAM-1, nos dois tipos celulares;
- Participação na transdução de sinal, por meio da regulação de quinases, que são capazes de se ligarem à vimentina, estabilizando-se, mas sem modificar a fosforilação do citoesqueleto (como é o caso da Raf-1 quinase e PKC ϵ);
- Regeneração neuronal, com expressão acentuada de vimentina logo após uma lesão no nervo. Seus fragmentos auxiliam na estabilização

de pERK1 e pERK2 MAP quinases fosforiladas, permitindo seu transporte do local da injúria para o núcleo, onde elas ativarão moléculas reparadoras da lesão. Isso demonstra que a vimentina pode agir como um sinalizador à distância;

- Participação no ciclo celular, sequestrando 14-3-3 ζ (um regulador do ciclo celular e apoptose), de modo a permitir ou impedir sua ligação com suas outras moléculas alvos, como o protooncogene *Raf*;
- Regulador de transcrição, pois a vimentina pode interagir e/ou sequestrar determinantes transcricionais, como o p53. Além de conseguir interagir com algumas estruturas especializadas contendo DNA, como DNA satélites, telômeros, DNA mitocondrial e transposons;
- Regulação da apoptose, uma vez que a quebra dos filamentos intermediários de vimentina, mediada pela ativação de caspases pró-apoptóticas, representa um momento chave na morte celular, com colapso do citoesqueleto responsável por dar forma às células, contribuindo para as mudanças morfológicas observadas nesse tipo de evento. Além disso, a quebra da vimentina pelas caspases gera fragmentos contendo a porção N-terminal da proteína, que é conhecida por ser extremamente pró-apoptótica.

3.3 AGRESSOMOS

O dobramento correto das proteínas dentro de uma célula pode falhar devido à incorporação errada de aminoácidos, fruto de uma mutação genética, erro na transcrição ou no processamento do mRNA ou erro na própria tradução. Alternativamente, fatores como estresse térmico (VIDAIR, HUANG E DOXEY, 1996 apud JOHNSTON, WARD E KOPITO, 1998), estresse osmótico e oxidativo (BUCHNER, 1996 apud JOHNSTON, WARD E KOPITO, 1998) ou mesmo interferência por produtos de genes virais (WIERTZ et al., 1996 apud JOHNSTON WARD E KOPITO, 1998) podem também interferir no dobramento das proteínas nascentes. O dobramento incorreto da proteína pode levar à exposição de sítios hidrofóbicos que normalmente se encontrariam escondidos no interior da proteína, forçando-a a adquirir formas não nativas que podem interagir entre si e se agregarem (JOHNSTON, WARD E KOPITO, 1998). De fato, muitas doenças neurodegenerativas

são definidas histopatologicamente por inclusões intracelulares compostas por agregados de proteína ubiquitinada e deposição anormal de filamentos intermediários (MAYER et al., 1989).

Considerando as complicações geradas pelas doenças degenerativas através do acúmulo de proteína mal dobrada, as células eucarióticas desenvolveram mecanismos para prevenir sua formação e/ou acúmulo. Chaperonas moleculares ligam-se a proteínas com conformação não nativa e ajudam-na em seu redobramento, por exemplo. Outro mecanismo é a retirada de proteínas mal dobradas do retículo endoplasmático e sua marcação com cadeias de poliubiquitina, para a degradação pelo proteassoma, através do ERAD (COHEN E TARABOULOS, 2003).

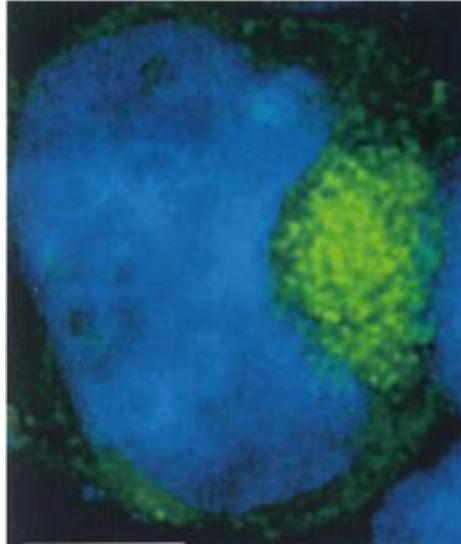
Em células não estressadas, cerca de 10% do PrP nascente acaba sendo mal dobrado. O porquê disso pode ser explicado pela baixa processividade de sua sequência sinal em N-terminal, que direciona o PrP em crescimento para o retículo endoplasmático e faz sua translocação na membrana do retículo. Devido a esse peptídeo sinal pouco eficiente, algumas moléculas de PrP falham ao serem translocadas na membrana, podendo permanecer no citosol celular, formando PrP_{cy}, ou mesmo permanecendo translocadas erroneamente na membrana do retículo, gerando as formas transmembrânicas de PrP (revisado por COHEN e TARABOULOS, 2003).

Em condições de homeostase celular, essas espécies de PrP_{cy} são logo degradadas pelo proteassoma (revisado por CHAKRABARTI, ASHOK E HEDGE, 2009). Entretanto, quando a capacidade celular de degradação da proteína mal dobrada é excedida, ou na presença de inibidores de proteassoma, tais espécies se acumulam no citosol, formando agressomos (JOHNSTON, WARD E KOPITO, 1998; KRISTIANSEN et al., 2005).

Agressomos são inclusões citoplasmáticas, livres de membrana, contendo proteína mal dobrada, ubiquitinada e envolta por uma gaiola de filamentos intermediários. São estruturas altamente organizadas que se formam no centro de organização de microtúbulos por um processo ordenado que requer estrutura intacta de microtúbulos e reorganização do citoesqueleto celular. Trata-se de uma resposta celular geral à proteína mal dobrada, e serve para estabilizar e restringir a disseminação das partículas de proteínas agregadas (JOHNSNTON, WARD E KOPITO, 1998). A vimentina é um dos componentes que compõem os agressomos, embora também possam haver outras proteínas de filamento intermediário envolvidas, além

de actina e tubulina (JOHNSTON, WARD E KOPITO, 1998; CORCHERO, 2016). A FIGURA 4 mostra um exemplo de agressomo.

FIGURA 4 – AGRESSOMO EM CÉLULA HEK293T.



Agresomo contendo expressão da proteína GFP- Δ F508 mostrado em verde. O núcleo da célula é mostrado em azul. FONTE: JOHNSTON, WARD E KOPITO, 1998.

Nos agressomos formados por prions, há a formação de uma gaiola composta de vimentina, além de co-localização de PrP com tubulinas, ubiquitina, chaperonas e proteínas do proteassoma (COHEN e TARABOULOS, 2003; KRISTIANSEN et al., 2005). Embora tais agregados de PrP não aparentem ser tóxicos para a célula (KRISTIANSEN et al., 2005), eles apresentam características que lembram a forma *scrapie*, como por exemplo a insolubilidade a detergentes e a resistência parcial à proteólise por proteinase K (COHEN e TARABOULOS, 2003), podendo causar sintomas semelhantes aos das infecções priônicas em células que apresentem acúmulos de PrP mal dobrado.

Além dos trabalhos com agressomos, que deixam clara a relação entre PrP e vimentina, trabalhos como os de Hartmann, Martins e Lima (2013) e Provansal et al. (2010) demonstram relação entre a expressão de PrP^C e PrP^{Sc} e a expressão celular de vimentina. Durante a superexpressão de PrP^C em células N2a, ocorre o decaimento significativo da expressão da vimentina (cerca de 2,5 vezes menor em células com superexpressão de PrP^C em comparação com células normais), enquanto durante a infecção com PrP^{Sc} há o aumento da mesma (cerca de 6,13 vezes maior em células com infecção de PrP^{Sc} em comparação com células em que há superexpressão de PrP^C) (PROVANSAL et al., 2010). Já no trabalho de Hartmann,

Martins e Lima (2013), analisou-se a expressão de vimentina em astrócitos com superexpressão de PrP^C e com depleção do mesmo. Para a superexpressão de PrP^C foram obtidos resultados semelhantes a Provansal et al. (2010), mas complementarmente, descobriu-se que a expressão de vimentina é maior em células incapazes de produzir PrP^C.

Tendo tais evidências em mãos, faz-se necessário esclarecer as possíveis relações entre as proteínas prion e vimentina no contexto de agressomos, analisando sua formação dentro da célula e as possíveis decorrências disso para a toxicidade celular e para as características físico-químicas de PrP^C. Enquanto trabalhos anteriores como o de Kristiansen et al. (2005) se utilizaram da forma infectante PrP^{Sc}, neste trabalho optamos por esclarecer as questões acima citadas frente ao acúmulo da forma citosólica PrP^{Cy}.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS CELULARES

Duas linhagens celulares foram escolhidas para os experimentos. A linhagem de células HeLa (ATCC® CCL-2™), célula humana de câncer de colo de útero, foi escolhida por sua alta quantidade endógena de vimentina (FRANKE et al., 1979), e pelas facilidades de cultivo e de experimentação, visto que ela tem alta taxa crescimento.

Outra linhagem celular escolhida foram as células N2a (ATCC® CCL-131™), células de neuroblastoma de camundongo. Essa linhagem foi escolhida por se tratar de células neuronais, sendo possível analisar os resultados em um mesmo contexto celular de uma infecção com PrP^{Sc}, por exemplo. Além disso, a célula é de origem murina assim como a maioria das sequências inseridas nos plasmídeos de expressão que serão utilizados nos experimentos, facilitando a interação entre as proteínas endógenas e recombinante e provendo um modelo mais real para o trabalho.

Abaixo, a TABELA 1 lista resumidamente as características de cada uma das linhagens celulares.

TABELA 1 – COMPARAÇÃO ENTRE AS LINHAGENS CELULARES UTILIZADAS.

	HeLa	N2a
Tecido	Epitélio de câncer de colo de útero	Neuronal
Espécie	Humano	Camundongo
Expressão endógena de PrP	Sim ⁽¹⁾	Sim ⁽³⁾
Expressão endógena de vimentina	Sim ⁽²⁾	Sim ⁽⁴⁾
Transfecção	Lipofectamina	Lipofectamina

⁽¹⁾ SCHROCK et al., 2009; ⁽²⁾ FRANKE et al., 1979; ⁽³⁾⁽⁴⁾ Confirmado por *Western Blot*.

FONTE: O autor (2017).

4.2 CULTIVO CELULAR

Ambas as linhagens celulares foram mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% soro fetal bovino inativado (SFB) e com antibiótico gentamicina na concentração de 1 µg/mL. No caso das células N2a, o meio foi suplementado também com solução de aminoácidos não essenciais 100x da

Life Technologies (11140076). As células foram mantidas em incubadora a 37°C e com 5% CO₂.

4.3 TRANSFEÇÃO E PLASMÍDEOS

As células foram transfectadas transientemente utilizando o reagente Lipofectamine® 2000 (Thermo Fisher Scientific) de acordo com o protocolo do fabricante, sendo utilizado 0,2 µg/poço de plasmídeo para uma placa de 96 poços, 0,8 µg/poço para placa de 24 poços e 4 µg para placa de 6 mm. O volume de lipofectamina usado para cada uma das placas foi igual a duas vezes a quantidade de DNA. Após 6 horas de transfecção, o meio de cultivo das células foi trocado para diminuir a toxicidade celular da lipofectamina, e também para a aplicação dos tratamentos às células. Os experimentos foram feitos após 24 horas de transfecção, ou 16 horas após o início dos tratamentos.

Os plasmídeos usados nas transfecções foram:

- pEGFP: plasmídeo que codifica para a proteína verde fluorescente (GFP);
- pEGFP-PrP^C: codifica o peptídeo sinal de PrP^C de camundongo (resíduos 1-23) na região N-terminal da proteína GFP e os resíduos 23-254 fusionados à porção C-terminal de GFP (LEE et al., 2001);
- pEGFP-PrP^{Cy}: codifica a proteína GFP fusionada à proteína PrP^C (resíduos 23-254) sendo que a última não apresenta o peptídeo sinal em seu N-terminal que a encaminha para o retículo endoplasmático, ficando assim presa no citosol celular (LEE et al., 2001);
- pcDNAP104L: plasmídeo que codifica a fração 23-254 do PrP^C murino, mas que apresenta uma alteração no aminoácido 104 de prolina para leucina. Essa modificação é correspondente à mutação no aminoácido 105 da proteína humana, que desencadeia a Síndrome de *Gerstmann–Sträussler–Scheinker* (GSS) (MASTRIANNI, 2010);
- pcDNAV179I: plasmídeo que codifica a fração 23-254 do PrP^C murino, mas que apresenta uma alteração no aminoácido 179 de valina para isoleucina. Essa modificação corresponde à mutação no aminoácido

180 da proteína PrP^C humana, responsável pela Doença de Creutzfeldt-Jacob (CJD) (MASTRIANNI, 2010).

As mutações P104L e V179I de PrP^C foram escolhidas com base no trabalho de Machado et al. (2012), pois foram as mutações que mais demonstraram características *scrapie-like* nos experimentos.

4.4 ANTICORPOS

Para os experimentos foram usados três diferentes anticorpos primários: anti-PrP^C policlonal produzido através de imunização de camundongos nocaute para PrP^C (ZANATA et al., 2002), na diluição de 1:1.000 para *Western Blot* e 1:100 nas imunofluorescências; anti-vimentina monoclonal feito em coelho da Abcam (ab92547), nas concentrações de 1:2.000 para o *Pull-Down*, 1:100 para as imunofluorescências e 1:4.000 nos demais experimentos; anti-vinculina monoclonal feito em camundongo da Sigma (V9131), na concentração de 1:10.000. A vinculina foi usada como controle de *loading* das proteínas nos experimentos de *Western Blot*.

Para as imunofluorescências, os anticorpos secundários usados foram anti-IgG de coelho, para a marcação de vimentina, conjugado ao fluoróforo Texas Red, na diluição de 1:200 ou conjugado ao fluoróforo Alexa 647, na diluição de 1:800; e anti-IgG de camundongo, para marcação de PrP, conjugado ao fluoróforo Alexa 488, na diluição de 1:500.

Os anticorpos secundários usados na técnica de *Western Blot* foram anti IgG de camundongo conjugado à enzima peroxidase da Sigma (A4416), para revelar PrP^C e vinculina; e anti IgG de coelho conjugado à peroxidase, também da Sigma (A0545), para revelar vimentina, ambos em diluição 1:4.000.

4.5 TRATAMENTOS CELULARES UTILIZADOS

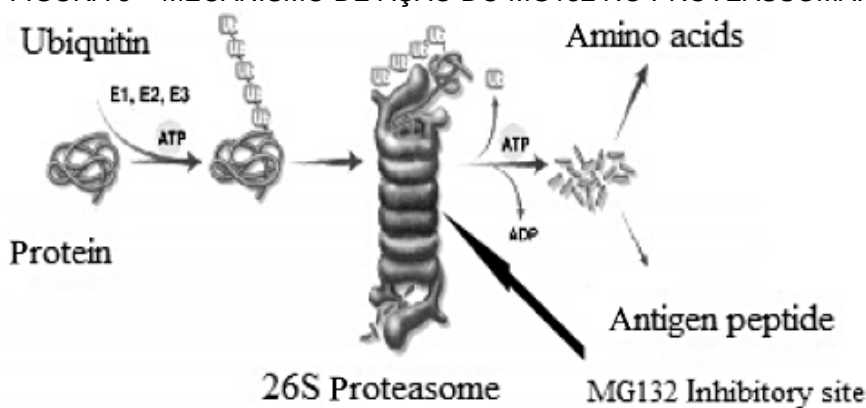
As células HeLa e N2a foram transfectadas com os plasmídeos listados no item 3.3, ou mantidas sem transfecção, e submetidas a tratamentos com dimetilsulfóxido (DMSO), MG132 ou ciclosporina A (CsA), sendo a última uma diluição do produto Sandimmun® 50 mg (Novartis).

A ciclosporina A é um peptídeo de origem fúngica amplamente usado como imunossupressor, e é também um inibidor da via das ciclofilinas, proteínas

encontradas no citosol e no retículo endoplasmático. As ciclofilinas são responsáveis pela aceleração da isomerização cis-trans das ligações X-Prolina (sendo X um aminoácido qualquer) durante o dobramento de PrP^C. Fazendo um tratamento com dose de 60 µg/mL de CsA, foi inibida a via das ciclofilinas, gerando PrP^C mal dobrado e induzindo assim a formação de agressomos (COHEN E TARABOULOS, 2003).

O peptídeo aldeído carbobenzoxil-L-leucil-L-leucil-L-leucinal, mais comumente conhecido como MG132, trata-se de um triterpeno com atividade inibidora de proteassoma. Sua ação se baseia em impedir a atividade da porção 20S do proteassoma (fração catalítica do proteassoma 26S) através da ligação covalente ao sítio ativo das subunidades beta, bloqueando assim a atividade catalítica (GUO E PENG, 2013). A FIGURA 5 ilustra seu local de ligação ao proteassoma.

FIGURA 5 – MECANISMO DE AÇÃO DO MG132 NO PROTEASSOMA.



FONTE: GUO E PENG, 2013.

Com base nos experimentos feitos por Dubnikov et al. (2016), decidimos usar o MG132 (Sigma, M7449) na concentração de 10 µM. Pelo fato de o MG132 ter como veículo o DMSO, decidimos utilizar o último como controle negativo das condições, na mesma concentração de 10 µM.

Todos os experimentos foram feitos após 16 horas de tratamento, pois, além de ser o tempo dos experimentos nas referências citadas, passadas 24 horas de tratamento, grande parte das células morriam no tratamento com MG132, dificultando assim a leitura de alguns resultados.

4.6 WESTERN BLOT

As amostras de proteínas, provenientes de extratos de células de diversos experimentos e tratamentos, foram quantificadas pela técnica de Bradford (BRADFORD, 1976), adicionadas de tampão de amostra redutor, e cerca de 50 µg de proteína de cada amostra foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12%, em uma eletroforese SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). As proteínas resolvidas foram transferidas para membrana ou de nitrocelulose ou de PVDF usando o sistema de Transferência em Tanque da Bio-Rad e tampão de transferência (192 mM glicina, 25 mM Tris e 20% metanol), nas condições de 300 mA por 75 minutos. As membranas foram então bloqueadas com 5% leite desnatado diluído em solução salina de Tris com Tween 20 (TBST – 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,4 e 0,05% Tween 20) por 1 hora. Após isso, as membranas foram incubadas com anticorpos primários e secundários, ambos diluídos na mesma solução de bloqueio. A incubação dos anticorpos primários foi feita *overnight* a 4°C sob agitação. A membrana foi então lavada com TBST e a incubação dos anticorpos secundários seguiu por 1 hora em temperatura ambiente. No final do processo, a membrana foi incubada com o substrato para a reação quimioluminescente, empregando-se os kits SuperSignal™ West Pico ou SuperSignal™ West Femto (Thermo Scientific). Filmes de auto-radiograma (Thermo Scientific) foram expostos à membrana em diversos tempos até a visualização das bandas de interesse.

4.7 PULL-DOWN

Os ensaios de *Pull-down* são necessários para verificar se a interação entre as proteínas PrP e vimentina ocorre *in vitro*, de modo a confirmar o resultado de possível interação obtido pelo método de duplo-híbrido em leveduras (GIMÉNEZ et al., 2015).

Células HeLa foram plaqueadas em placa de cultivo de 10 cm e, no dia seguinte, foi feito o extrato de células. As células foram removidas de sua placa com o *scraper*, lisadas mecanicamente com uma seringa e tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,2% deoxicolato de sódio, 1% NP40, 0,5% Triton X-100 e inibidores de protease PMSF e NEM em concentração final 1 mM) e centrifugadas a 18.400 xg por 15 minutos a 4°C. O extrato, obtido a partir do sobrenadante desta centrifugação, foi

submetido a duas etapas idênticas de clareamento. Para cada uma delas, foram preparados dois microtubos contendo 30 μL de resina níquel-agarose (Qiagen), 1 mg do extrato de células e volume suficiente de Tampão A (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM NaH_2PO_4 , 25 mM imidazol e 1% Triton X-100) para completar 1 mL de suspensão. Os microtubos foram deixados por 1 hora em orbital a 4°C e, terminada a incubação, as amostras foram centrifugadas a 2.500 xg por 1 minuto, em temperatura ambiente. As resinas, com possíveis ligações inespecíficas com o extrato, foram descartadas, os sobrenadantes foram coletados, homogeneizados e resina nova foi adicionada a estes, para a segunda etapa do clareamento. Após as duas etapas de clareamento, supôs-se que não mais havia interações inespecíficas entre o extrato e a resina.

Os extratos clarificados foram então divididos em duas frações: F1 que receberia 90 μg da proteína recombinante 6His-PrP^C purificada (ZANATA et al., 2002), e F2 que receberia igual volume adicionado na fração F1, mas contendo apenas Tampão A. Ambas as frações foram incubadas em orbital por 2 horas a 4°C. No caso de F1, esperava-se que a proteína recombinante 6His-PrP^C interagisse com seus parceiros moleculares durante a incubação e, por outro lado, em F2 não era esperada nenhuma interação. Após as 2 horas, cada fração foi dividida em dois microtubos e adicionada de 30 μg da resina de níquel-agarose (Qiagen). Esta separação visava promover maior superfície de contato entre o sobrenadante e a resina, permitindo que maior quantidade de proteína se aderisse à ela. Os quatro microtubos foram então incubados em orbital à temperatura ambiente por 1 hora, para promover a atração entre a cauda de histidina da proteína recombinante e o níquel conjugado à resina de agarose. As amostras foram depois centrifugadas a 2.500 xg por 1 minuto e os sobrenadantes foram descartados.

As resinas coletadas foram lavadas seis vezes com Tampão A e uma vez com Tampão B (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM NaH_2PO_4 , 50 mM imidazol, 1% Triton X-100 e 0,01% SDS), com centrifugações de 2.500 xg por 30 segundos a cada lavagem, para a retirada de quaisquer moléculas que pudessem ter se ligado fracamente à resina. As proteínas que permaneceram fortemente ligadas às resinas foram eluídas com tampão de amostra e separadas por eletroforese SDS-PAGE, seguido de *Western Blot* com anticorpo anti-vimentina, de modo a evidenciar a interação desta com PrP^C.

4.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA

A técnica de imunofluorescência serve para evidenciar visualmente a possível interação entre as proteínas vimentina e PrP, verificando se há co-localização dessas proteínas e a formação de agressomos, sob diversos contextos celulares e tratamentos. Para que os resultados fossem obtidos com clareza, foi preciso realizar primeiramente a padronização da técnica, garantindo que artefatos não fossem considerados resultados.

As imagens foram produzidas no Laboratório de Microscopia Confocal da Universidade Federal do Paraná, por meio do microscópio confocal Nikon A1RSiMP (NIKON, Tokyo, Japan), utilizando as objetivas de 20x, 60x e 100x, sendo as duas últimas imersas em óleo, com aberturas numéricas de 0,75, 1,40 e 1,45 respectivamente.

4.8.1 Padronização da permeabilização

Baseando-se em artigos de imunofluorescências (JOHNSTON, WARD E KOPITO, 1998; KRISTIANSEN et al., 2005; COHEN E TARABOULOS, 2003), foi possível perceber que a permeabilização das células era feita por três vias diferentes: metanol 100%, Triton X-100 ou saponina. Para saber qual desses se adequava mais às condições do projeto, decidimos testar diferentes combinações de tempo e tratamento. O protocolo base para essa padronização foi modificado de Kristiansen et al. (2005).

As células HeLa foram inicialmente plaqueadas em lamínulas de vidro de 13mm em meio de cultivo apropriado. No dia seguinte, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) gelado e fixadas com 4% paraformaldeído por 20 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas com PBS e permeabilizadas com Triton X-100, saponina ou metanol 100% (a -20°C), em diferentes concentrações e tempos. As células foram então lavadas com PBS e bloqueadas com solução de 5% albumina sorológica bovina (BSA) em PBS por 1 hora. Depois do bloqueio, seguiu-se com a incubação dos anticorpos primários anti-vimentina e anti-PrP diluídos em PBS + 0,5% BSA, por 2 horas em temperatura ambiente. Passadas as duas horas, as lâminas foram lavadas com PBS + 0,5% BSA e incubadas com os anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Texas Red e anti-IgG de camundongo

conjugado ao fluoróforo Alexa 488. Ambos os anticorpos foram diluídos em solução de PBS + 0,5% BSA e incubados por 1 hora em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Terminadas as marcações com os anticorpos, as lâminas foram lavadas extensivamente com PBS, seguidas de rápida lavagem com água ultrapura e montagem em lâmina com solução de glicerol 70% e DAPI 1:1000 em PBS.

As condições de permeabilização testadas são mostradas na TABELA 2.

TABELA 2 – CONDIÇÕES DE PERMEABILIZAÇÃO USADAS PARA A IMUNOFLOURESCÊNCIA.

Metanol 100% (-20°C)	1, 2, 3, 4, 5, 6 e 15 minutos	
Triton X-100	Com 5% BSA	0,05% e 0,1% (60 minutos)
	Sem BSA	0,05%, 0,1%, 0,25% e 0,5% (10 minutos)
Saponina 0,01%	Com 5% BSA	1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 e 60 minutos
	Sem BSA	1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15 e 20 minutos

FONTE: O autor (2017).

4.8.2 Padronização da marcação de PrP^C

O próximo passo da padronização foi aumentar a especificidade das marcações de PrP^C. Recorremos ao trabalho de Trindade et al. (2012) para vislumbrar possíveis melhorias no protocolo previamente utilizado.

No novo protocolo, no dia posterior ao plaqueamento das células em lamínulas de 13 mm, fez-se extensiva lavagem das mesmas com PBS gelado e um sutil bloqueio de 10 minutos com 1% BSA diluído em PBS, em banho de gelo. Após isso, incubou-se o anticorpo primário anti-PrP diluído em solução de 1% BSA por 1 hora em geladeira. Essa antecipação da incubação do anticorpo primário serve para melhorar a marcação da membrana antes que seja feita a permeabilização das células, deixando os PrP^C de membrana mais evidentes durante a captura das imagens. Dada a uma hora de incubação, foram feitas três lavagens com PBS, uma lavagem com PBS + 1% BSA e duas vezes com PBS novamente, para então seguirem para a fixação com 4% paraformaldeído por 30 minutos, em temperatura ambiente. Com a fixação terminada, as células foram lavadas duas vezes com PBS, uma vez com solução de 0,1 M glicina em PBS para o bloqueio dos radicais de aldeídos livres, e

lavadas mais duas vezes com PBS, para a retirada da glicina remanescente. As células seguiram então para a permeabilização com 0,01% saponina em PBS por 5 minutos, três lavagens com PBS posteriores e bloqueio com 1% BSA por 20 minutos.

Terminada a permeabilização e o bloqueio, as células foram incubadas com os anticorpos primários anti-PrP e anti-vimentina, ambos diluídos em PBS + 1% BSA + 0,01% saponina, por uma hora, em geladeira. Após esta etapa, as células foram lavadas com PBS + 0,01% saponina, e depois lavadas três vezes somente com PBS, para então seguirem para a incubação com os anticorpos secundários. Os anticorpos secundários usados foram anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Texas Red ou ao fluoróforo Alexa 647 (ambos mostrados com coloração vermelha), e anti-IgG de camundongo conjugado ao fluoróforo Alexa 488 (mostrado com coloração verde), ambos diluídos em PBS + 0,01% de saponina. As lamínulas com os anticorpos secundários ficaram incubando por 40 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Ao término da incubação, as lamínulas foram extensivamente lavadas com PBS e com água ultra pura para posterior montagem em lâmina com solução de glicerol 70% e DAPI 1:1000 em PBS.

4.8.3 Células e tratamentos na imunofluorescência

Todas as imunofluorescências pós-padronização da técnica seguiram o protocolo descrito no item anterior. Tanto células HeLa quando N2a foram transfectadas com os plasmídeos descritos no tópico 3.3 e tratadas com DMSO, MG132 ou CsA posteriormente. Esses tratamentos visavam evidenciar diferenças na morfologia do citoesqueleto, aparecimento de agressomos, formação de depósitos citosólicos de PrP, co-localização de PrP e vimentina ou mesmo alterações morfológicas na célula como um todo. Os controles de anticorpos secundários para cada uma das células podem ser vistos no APÊNDICE 1.

4.9 QUANTIFICAÇÃO DA VIMENTINA SOB DIVERSOS TRATAMENTOS

Como anteriormente descrito nos trabalhos de Hartmann, Martins e Lima (2013) e Provansal et al. (2010), a expressão de vimentina pode ser modulada com a superexpressão de PrP^C ou com a infecção da célula com PrP^{Sc}. Tendo em vista que algumas das propostas do trabalho eram verificar se PrP^{Cy} pode ser tóxico ou mesmo

se comportar como PrP^{Sc}, e se a formação de agressomos acontece sob esses contextos, decidimos testar se a quantidade de vimentina expressa nas células HeLa e N2a era capaz de ser alterada com a superexpressão de GFP, GFP-PrP^C, GFP-PrP^{Cy}, PrP^C P104L e V179I, e com tratamentos com DMSO, MG132 e CsA.

Para este experimento foram utilizadas placas de 6 poços com HeLa e N2a, transfectadas conforme o protocolo descrito anteriormente. No dia seguinte à transfecção, foram realizados os extratos das células com tampão de lise e estes foram aplicados em gel de poliacrilamida para a realização da técnica de *Western Blot*. As membranas de nitrocelulose com as proteínas resolvidas no gel foram então incubadas com anticorpo primário anti-vimentina e anticorpo secundário anti-IgG de coelho para evidenciar a presença das diferentes quantidades de vimentina em cada uma das condições. As membranas foram incubadas depois com anticorpo primário anti-vinculina e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo para se realizar a normalização da quantidade de proteínas. A quantificação da intensidade das bandas foi realizada no software Fiji ImageJ, os cálculos de normalização foram realizados no software Excel e os gráficos foram plotados no software GraphPad Prism.

4.10 ENSAIO DE MORTE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT

O ensaio de viabilidade celular tem como premissa avaliar se as transfecções e os tratamentos com as células têm efeito em sua taxa de sobrevivência, testando se alguma condição pode ser mais ou menos tóxica, através da atividade metabólica da célula.

A técnica tem como reagente principal o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, denominado MTT, um componente de cor amarela carregado positivamente. O MTT entra nas células e se dirige às mitocôndrias, se as células estiverem viáveis, e portanto metabolicamente ativas, o MTT terá seu anel de tetrazólio convertido a formazan pelas oxirredutases mitocondriais, adquirindo coloração púrpura. Por outro lado, quanto menos viável estiver a célula, menor será a quantidade de formazan produzido e mais fraca será a intensidade da cor.

Células N2a e HeLa foram plaqueadas em placas de 96 poços, transfectadas com plasmídeos capazes de expressar GFP, GFP-PrP^C, GFP-PrP^{Cy}, PrP^C P104L e V179I, e tratadas com DMSO, MG132 e CsA.

Dada as 16 horas dos tratamentos, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas por 3 horas com 100 μ L da solução de MTT (diluído em PBS na concentração de 0,5 mg/mL) a 37°C. Após isso, a solução de MTT foi retirada e o pigmento roxo restante na placa foi dissolvido com 100 μ L de DMSO. A leitura da absorbância foi feita em leitor de placas a 550 ou 570 nm. Os cálculos de porcentagem de sobrevivência foram realizados no software Excel e os gráficos foram plotados utilizando o software GraphPad Prism.

4.11 SOLUBILIDADE DE PRP^C COM METANOL

Em uma infecção por PrP^{Sc}, a forma normal da proteína PrP^C é convertida à forma PrP^{Sc}, que se torna insolúvel e parcialmente resistente à degradação por proteases (revisado por LINDEN et. al, 2008). Para avaliarmos se alguns dos tratamentos faziam com que PrP adquirisse características semelhantes a *scrapie*, ficando mais insolúvel, decidimos fazer o teste de solubilidade com metanol.

As células HeLa e N2a foram plaqueadas em placas de 6 poços, transfectadas e tratadas como descrito anteriormente. As células foram então descoladas das placas e lisadas mecanicamente com 100 μ L tampão de lise, seguindo para centrifugação a 16.000 xg por 30 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram separados e os *pellets* foram mantidos, ao invés de serem descartados como de costume. Aos *pellets* foi adicionado 100 μ L de tampão de lise para sua ressuspensão. Cada uma das frações, *pellet* e sobrenadante, de cada condição recebeu 400 μ L de metanol 100%, foram homogeneizadas e colocadas em freezer -80°C para a precipitação *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 10.000 xg por 10 minutos a 4°C e os *pellets* da centrifugação foram ressuspendidos com tampão de amostra. As amostras foram resolvidas em gel de SDS-PAGE para depois seguirem para o *Western Blot*.

5 RESULTADOS

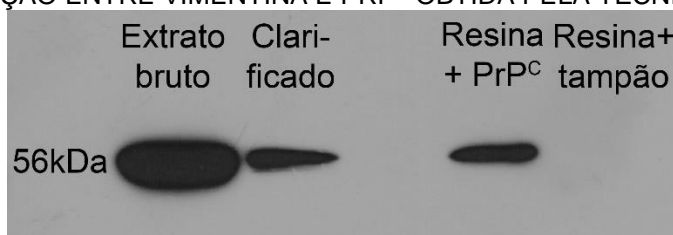
5.1 PULL-DOWN

Como já mencionado, resultados anteriores do nosso grupo mostraram, através da técnica de duplo-híbrido em leveduras, que a vimentina era um potencial ligante para PrP^C (GIMÉNEZ et al., 2015). Na tentativa de confirmar essa interação, realizamos o ensaio de *Pull-down*. A técnica de *Pull-Down* foi eficiente em confirmar a interação *in vitro* entre a proteína vimentina, proveniente do extrato de células HeLa, e a proteína prion celular (PrP^C) recombinante conjugada à cauda de histidina.

Como é possível observar na FIGURA 6, grande parte da vimentina do extrato bruto foi perdida ao longo dos dois processos de clarificação da amostra. Possivelmente, essa perda deve-se ou a interações inespecíficas diretamente entre a vimentina e a resina de níquel-agarose, ou mesmo entre a vimentina e as demais proteínas do extrato de células, sendo que estas possam ter sido atraídas pela resina, sendo então descartadas durante as clarificações das amostras.

A porção de vimentina que permaneceu no clarificado foi submetida à interação com a proteína recombinante 6His-PrP^C (amostra nomeada na figura como “Resina + PrP^C”) ou com controle negativo contendo apenas tampão A (denominada na figura “Resina + tampão”).

FIGURA 6 – INTERAÇÃO ENTRE VIMENTINA E PRP^C OBTIDA PELA TÉCNICA DE *PULL-DOWN*.



FONTE: O autor (2015).

Na fração “Resina + tampão” não houve a formação de nenhuma banda de vimentina, indicando que não há a precipitação da proteína quando somente em contato com a resina e o tampão A. Por outro lado, na fração em que houve a incubação com a proteína recombinante 6His-PrP^C, foi possível detectar uma banda correspondente à vimentina. Esse resultado é capaz de comprovar a interação *in vitro* entre PrP^C e vimentina.

5.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Na tentativa de aprofundar a investigação da interação entre PrP^C e vimentina, foi necessário utilizar a técnica de imunofluorescência para verificar se há co-localização dessas proteínas e a formação de agressomos, sob determinados contextos celulares e tratamentos. Primeiramente, foi preciso realizar a padronização da técnica, como descrito a seguir.

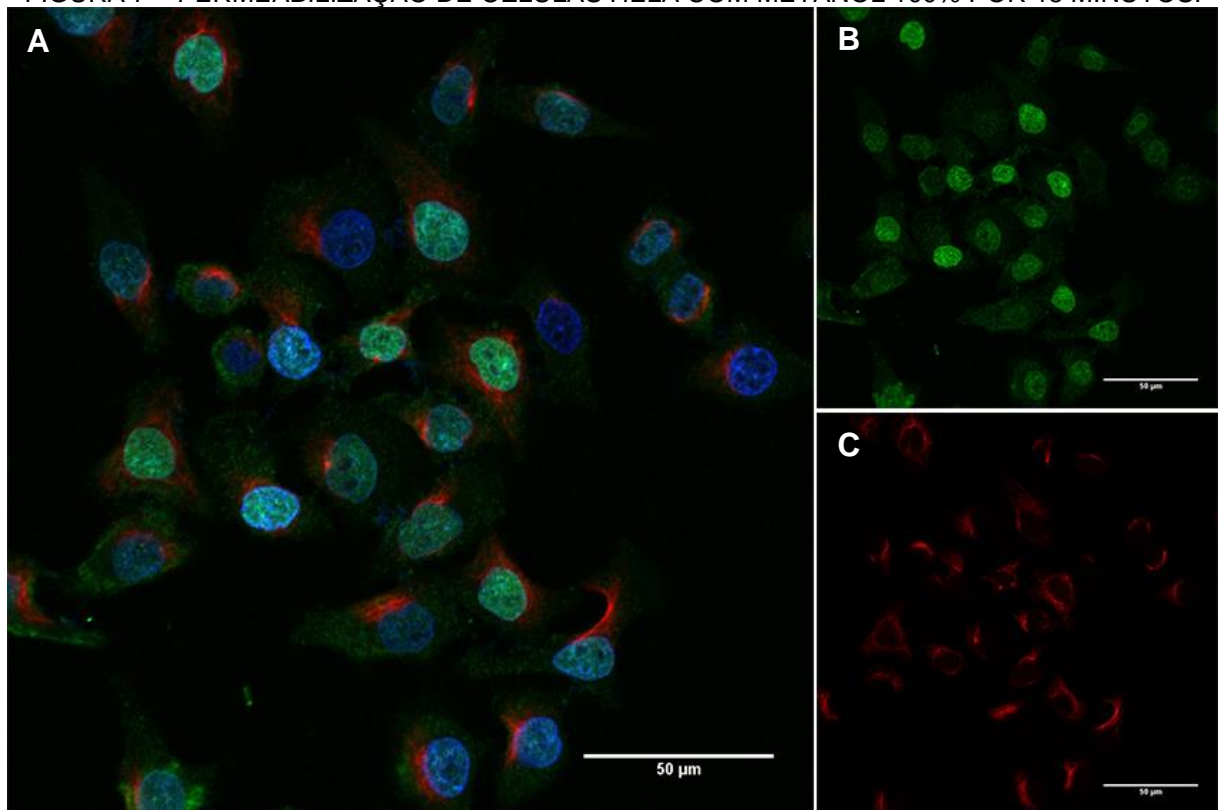
5.2.1 Padronização da permeabilização

5.2.1.1 Metanol

O primeiro método de permeabilização testado foi o com metanol, como era descrito no protocolo original de Kristiansen et al. (2005). No artigo, o metanol a -20°C deveria ficar em contato com as células durante 15 minutos para a permeabilização.

A primeira tentativa foi feita seguindo o método descrito no protocolo, e o resultado é mostrado na FIGURA 7A. É possível perceber que a ação do metanol foi mais forte do que o desejado, pois a marcação de PrP (FIGURA 7B) que deveria estar na membrana plasmática, apresentava-se dispersa pela célula, estando inclusive em compartimentos nucleares, possivelmente tendo extravasado devido à permeabilização da membrana nuclear. A alta permeabilização permitiu total acesso dos anticorpos anti-vimentina ao citoesqueleto (FIGURA 7C), entretanto este não apresentava forma fibrilar característica, que deveria estender-se por toda a célula, mas aparecia irregularmente em algumas porções desta. É possível que a permeabilização em excesso tenha causado danos ao citoesqueleto celular.

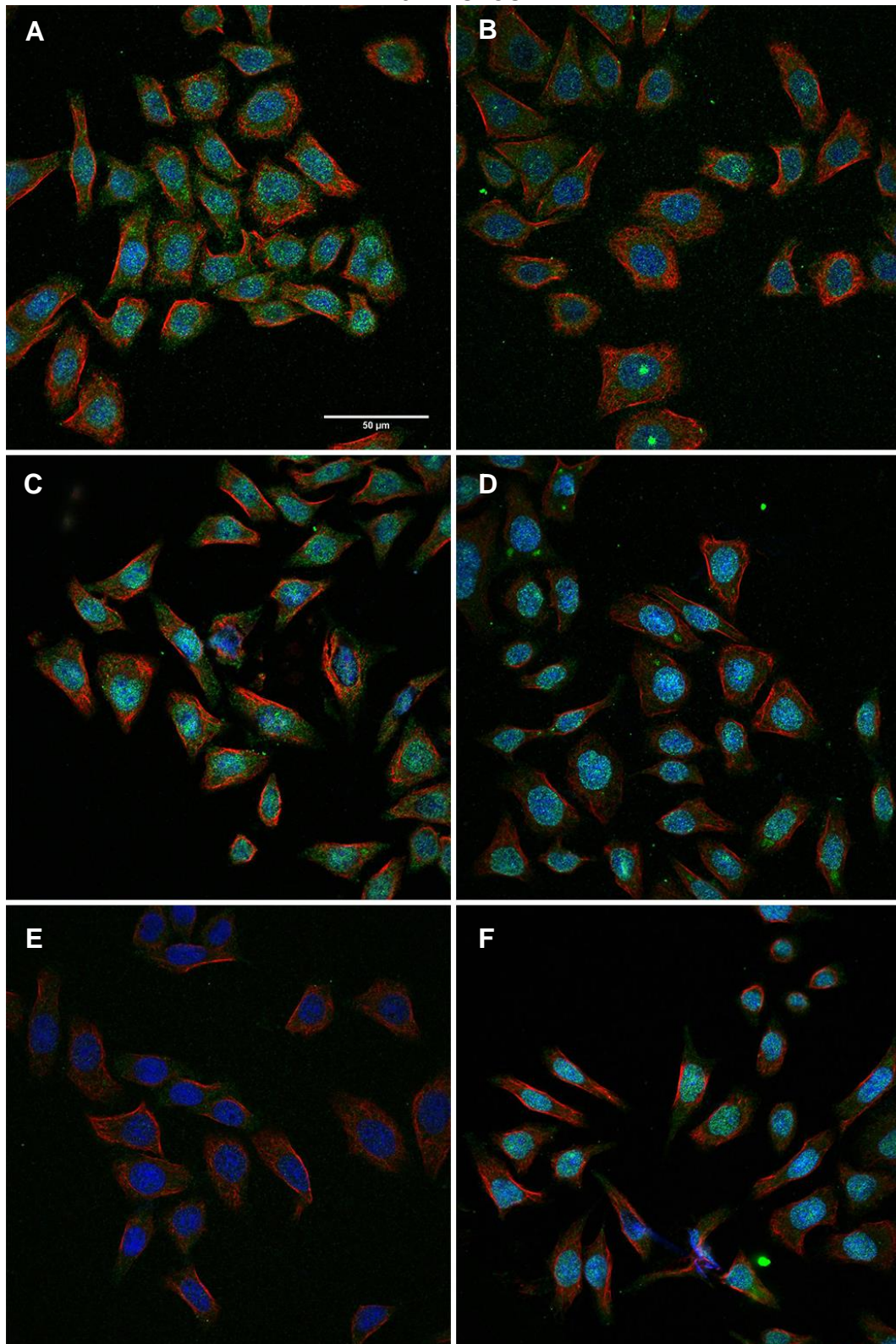
FIGURA 7 – PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULAS HELA COM METANOL 100% POR 15 MINUTOS.



PrP^C é mostrado em verde, vimentina em vermelho e núcleo com DAPI em azul. A) Sobreposição dos três canais de fluorescência (verde, azul e vermelho). B) Marcação de PrP. C) Marcação de vimentina. As barras são equivalentes a 50 μm. FONTE: O autor (2017).

Com a finalidade de minimizar os efeitos destrutivos do metanol 100% nas membranas plasmática e nuclear, e no citoesqueleto, outros tempos de permeabilização foram testados, variando de 1 a 6 minutos. As fotos correspondentes a cada um destes testes são mostradas nas FIGURAS 8 A-F.

FIGURA 8 – PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULAS HELA COM METANOL 100% NOS TEMPOS DE 1 A 6 MINUTOS.



Tempos de permeabilização de 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E) e 6 minutos (F) com metanol 100% a -20°C. PrP^C é mostrado em verde, vimentina em vermelho e núcleo com DAPI em azul. A barra indica 50 µm. FONTE: O autor (2017).

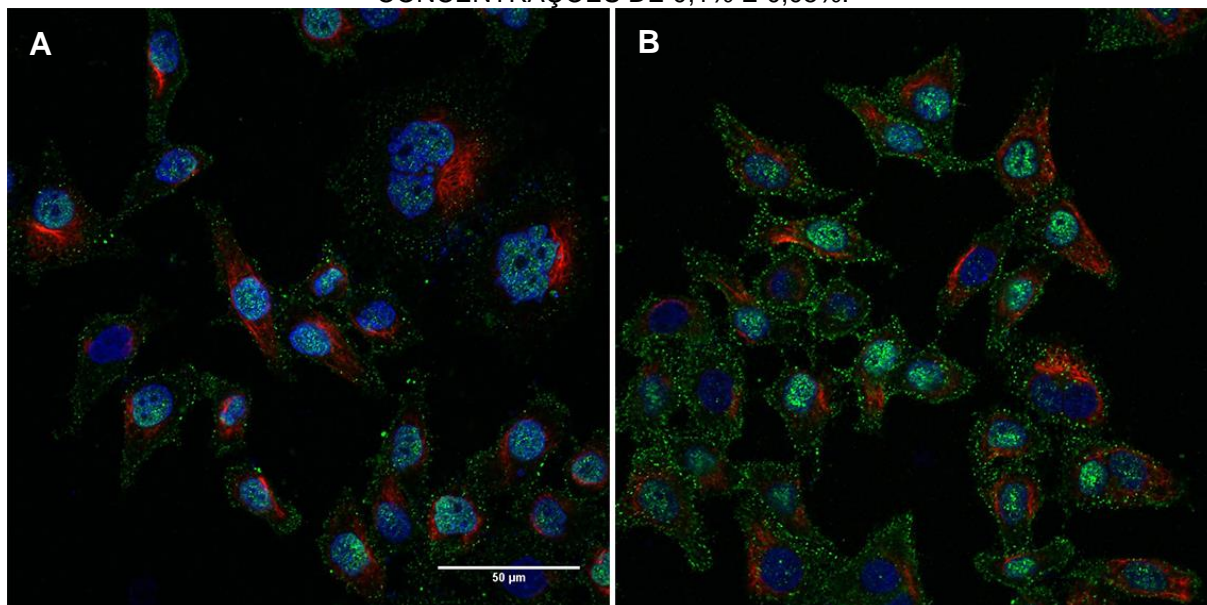
À medida que aumentamos o tempo de permeabilização com o metanol, melhor é a marcação do citoesqueleto (FIGURAS 8D, E e F), ao custo de a membrana ser completamente retirada das células, uma vez que não é possível visualizar a fluorescência verde da marcação de PrP^C em torno do citoesqueleto vermelho. Por outro lado, mesmo no menor tempo de permeabilização, que corresponde a 1 minuto (FIGURA 8A), já é possível observar fluorescência verde no núcleo da célula, problema anteriormente observado. A partir destes resultados, decidimos não utilizar a permeabilização com metanol.

5.2.1.2 Triton X-100

Grande parte dos artigos que usavam triton X-100 na etapa de permeabilização, o faziam na concentração de 0,1%, mas alguns trabalhos também empregavam concentrações acima e abaixo deste valor. Devido a essa incerteza nos valores, decidimos primeiramente testar as concentrações de 0,1% e 0,05% de triton X-100 diluído em PBS + 5% BSA e deixando a solução incubando por 60 minutos, fazendo assim a permeabilização e o bloqueio das células ao mesmo tempo.

O resultado das imagens foi relativamente melhor do que o obtido com o metanol 100%, como é demonstrado na FIGURA 9. A fluorescência verde do PrP se mostrou mais nítida e localizada prioritariamente na membrana, todavia, o problema de fluorescência verde no núcleo se mantinha em ambos os experimentos com 0,1% (FIGURA 9A) e 0,05% (FIGURA 9B) de triton X-100.

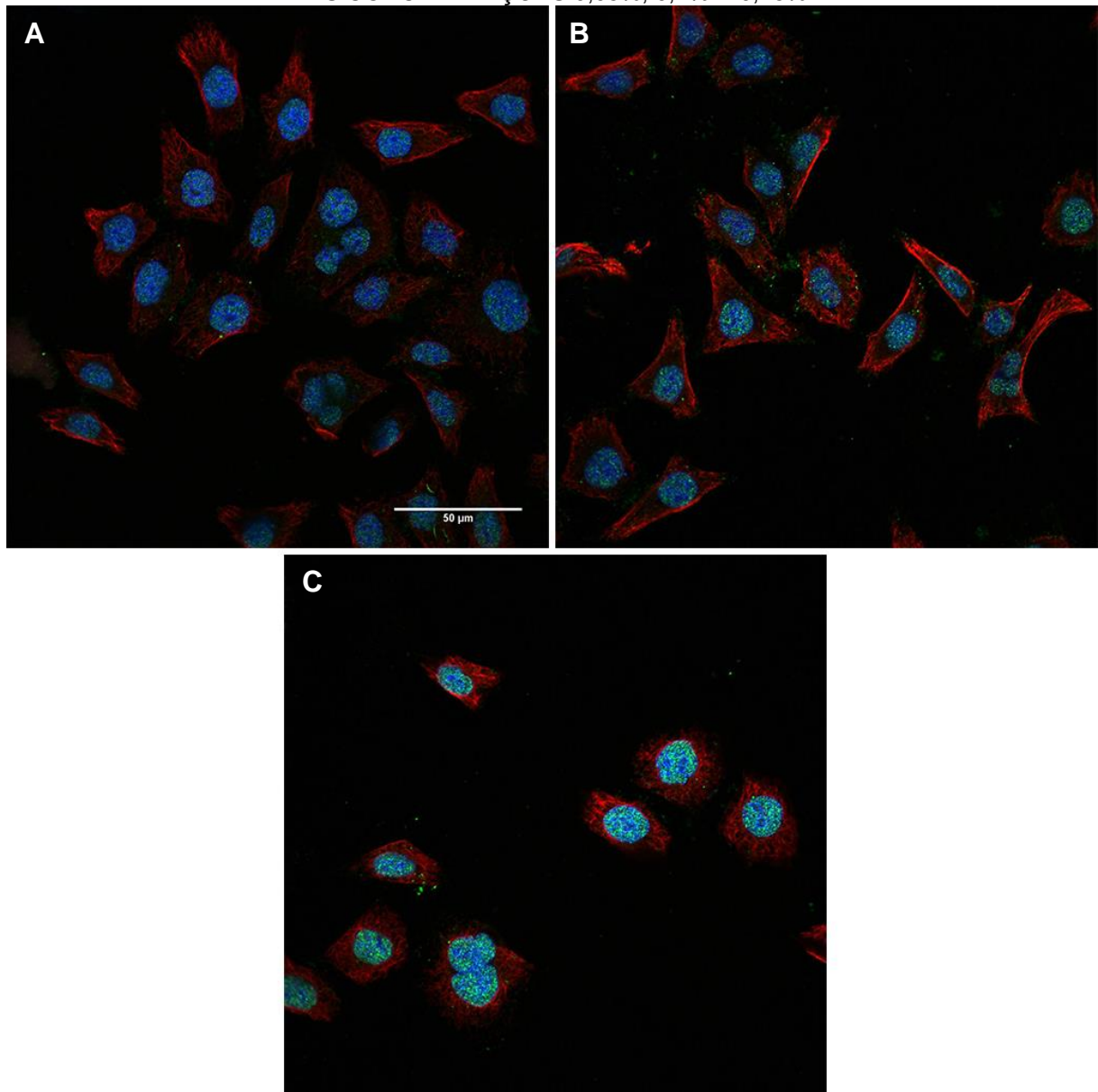
FIGURA 9 – PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULAS HELA COM TRITON X-100 NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,1% E 0,05%.



Células HeLa permeabilizadas com triton X-100 nas concentrações de 0,1% (A) e 0,05% (B). PrP^C é mostrado em verde, vimentina em vermelho e núcleo com DAPI, em azul. A barra indica tamanho de 50 μm. FONTE: O autor (2017).

Acreditando que o extravasamento da fluorescência ocorresse por causa do tempo excessivo de permeabilização, resolvemos separar as etapas de permeabilização e bloqueio, e testar outras concentrações de triton X-100. Decidimos arbitrariamente pelo tempo de permeabilização de 10 minutos, e testamos as concentrações do detergente de 0,05%, 0,1%, 0,25% e 0,5%. Além disso, como não era mais necessário fazer bloqueio das células simultaneamente, o triton X-100 foi dissolvido apenas em PBS, retirando assim o BSA da solução. Inesperadamente, a permeabilização feita dessa maneira se mostrou ainda mais forte que a anterior, mesmo para as concentrações menores, como 0,05% (FIGURA 10A) e 0,1% (FIGURA 10B), já testadas anteriormente. A fluorescência verde sumiu quase que por completo em todas amostras, sendo que nas concentrações mais fortes de 0,25% (FIGURA 10C) e 0,5% (não mostrado), as células ficaram parcialmente destruídas e o núcleo foi permeabilizado, tal como ocorreu nos experimentos anteriores de triton X-100 e metanol 100%.

FIGURA 10 – PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULAS HELA COM TRITON X-100 POR 10 MINUTOS NAS CONCENTRAÇÕES 0,05%, 0,1% E 0,25%.



Células HeLa permeabilizadas com triton X-100 por 10 minutos nas concentrações de 0,05% (A), 0,1% (B) e 0,25% (C). PrP^C é mostrado em verde, vimentina em vermelho e núcleo com DAPI, em azul. A barra indica tamanho de 50 μm . FONTE: O autor (2017).

Devido ao fato de alguns experimentos paralelos com saponina estarem apresentando resultados mais satisfatórios, decidimos focar em padronizar a permeabilização com a saponina.

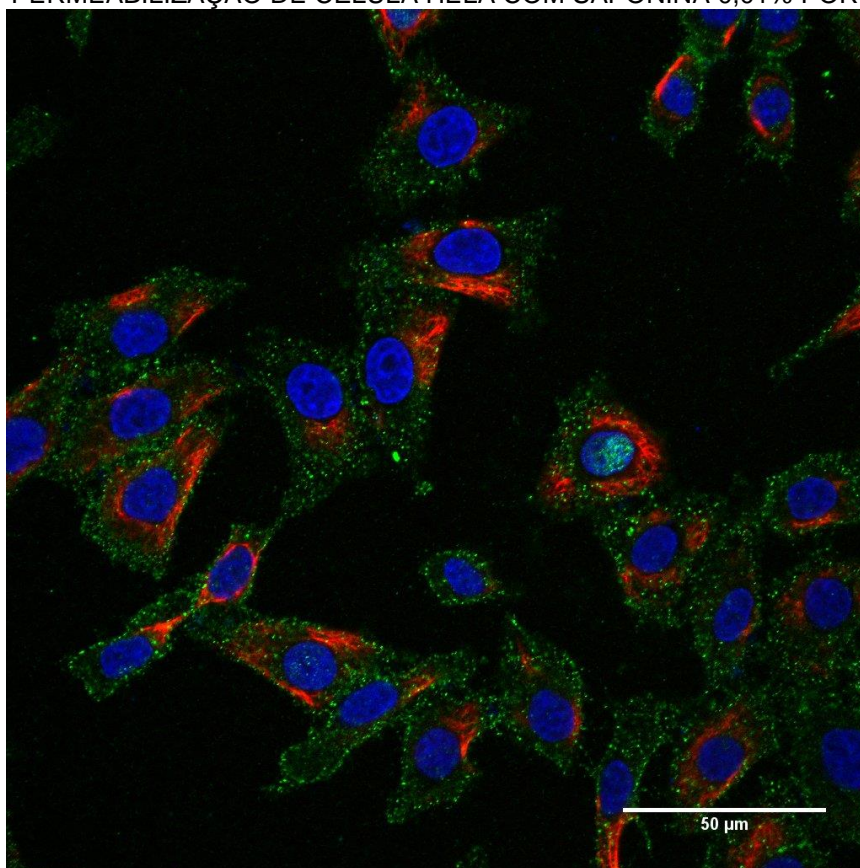
5.2.1.3 Saponina

Apesar de os artigos em que nos baseamos anteriormente não usarem a saponina como permeabilizante das células, olhando referências de

imunofluorescência no geral, como o trabalho de Trindade et al. (2012), resolvemos testá-la para verificar se a reação poderia ser melhor do que as demais alternativas testadas. Inicialmente, usamos a saponina a 0,01% diluída em PBS + 5% BSA e incubamos as células por 60 minutos, fazendo assim a permeabilização e o bloqueio das células ao mesmo tempo.

Este primeiro resultado obtido com a saponina, visualizado na FIGURA 11, já se mostrou mais bem-sucedido do que os demais experimentos. A quantidade de fluorescência verde no núcleo foi bem baixa, o formato da célula permaneceu intacto e as fluorescências verde e vermelha estavam nítidas. Um dos problemas observados, todavia, é que a vimentina parecia estar mais encolhida em lugares específicos da célula do que espalhada por toda sua extensão.

FIGURA 11 – PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULA HELA COM SAPONINA 0,01% POR 60 MINUTOS.

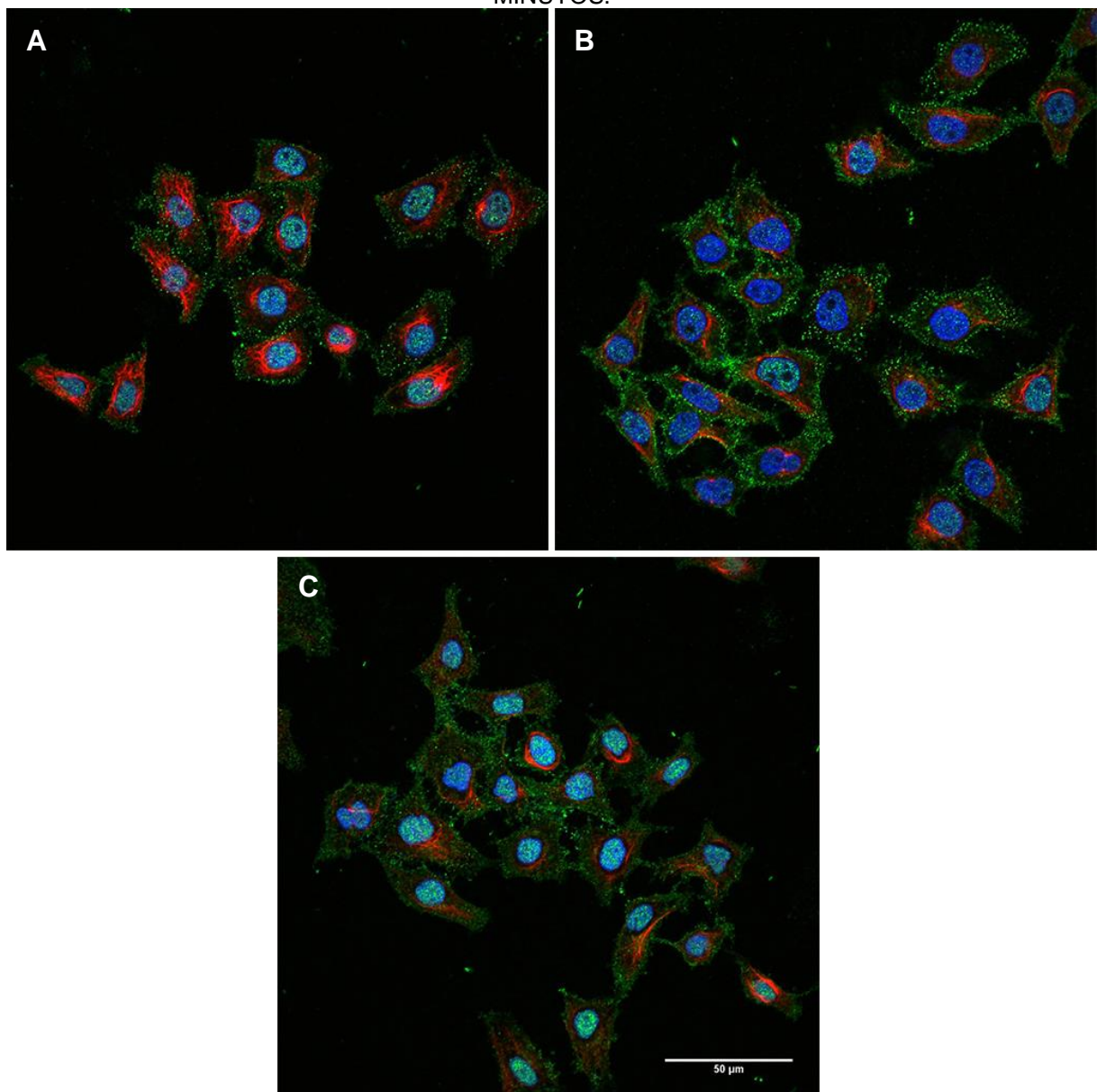


Células HeLa permeabilizadas e bloqueadas simultaneamente com saponina 0,01% diluída em PBS e BSA. PrP^C é mostrado em verde, vimentina em vermelho e núcleo com DAPI em azul. A barra é equivalente a 50 µm. FONTE: O autor (2017).

Tentando melhorar a aparência da vimentina, recorreremos ao mesmo método utilizado para o triton X-100: separar a permeabilização do bloqueio, diminuir os tempos de incubação e solubilizar a saponina apenas em PBS. Os tempos testados

foram de 5, 10, 15 e 20 minutos (FIGURA 12). Dos quatro tempos testados, os que apresentaram melhor aparência tanto para vimentina quanto para PrP^C foram 5 e 10 minutos de incubação (FIGURAS 12A e B, respectivamente). Os tempos de 15 (FIGURA 12C) e 20 minutos (não mostrado) geraram núcleo manchado com fluorescência verde e deformação da célula, por uma ação exagerada da saponina. É possível ver também que a vimentina não mais aparecia encolhida em um canto na célula, mas sim bem mais dispersa do que anteriormente.

FIGURA 12 – PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULAS HELA COM SAPONINA EM TEMPO DE 5 A 15 MINUTOS.

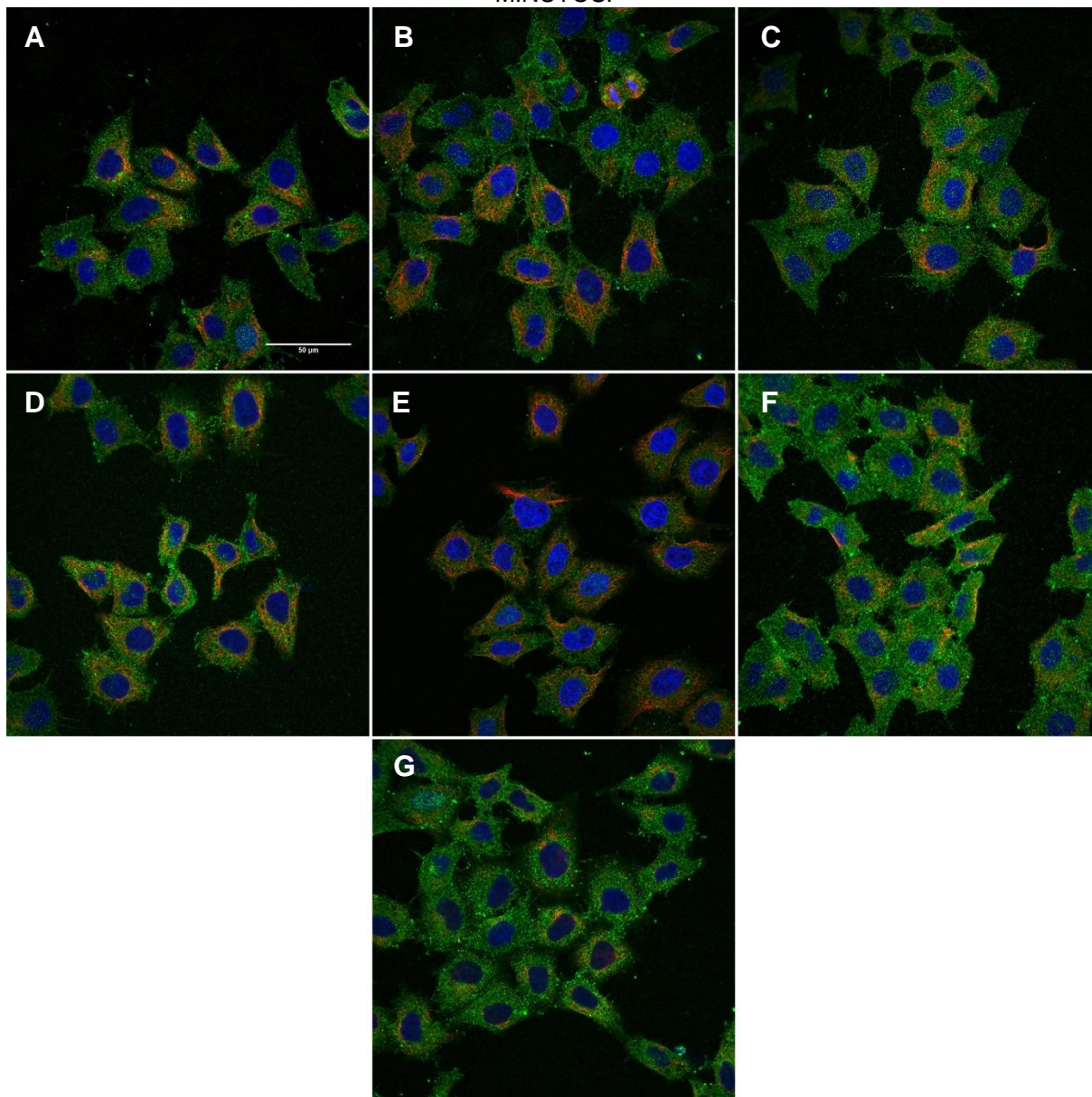


Permeabilização com saponina 0,01% dissolvida em PBS nos tempos de 5 (A), 10 (B) e 15 (C) minutos. PrP^C é mostrado em verde, vimentina em vermelho e núcleo com DAPI em azul. Dos três experimentos mostrados, o tempo de 5 minutos (A) foi o que mais se mostrou promissor. A barra indica tamanho de 50 μm. FONTE: O autor (2017).

A partir do experimento anterior, pudemos perceber que o tempo ótimo de permeabilização com saponina encontrava-se entre 0 e 10 minutos de incubação. Por isso, resolvemos explorar melhor os tempos intermediários, fazendo permeabilizações de 1 a 5 minutos, 7 e 10 minutos. Além disso, testamos com a saponina a 0,01% diluída ou apenas em PBS, ou diluída em PBS + 5% BSA, para saber se o efeito da vimentina encolhida, obtida no primeiro experimento com a saponina (FIGURA 11), era resultado da interação do BSA ou apenas da permeabilização prolongada.

Na FIGURA 13 podemos ver parte dos resultados do experimento, em que foi usada saponina diluída apenas em PBS. Os tempos de 1, 2 e 3 minutos (FIGURAS 13A, B e C, respectivamente) demonstraram baixa permeabilização da célula, evidenciada pela fraca coloração em vermelho da vimentina. Os tempos maiores, de 7 e 10 minutos (FIGURAS 13F e G, respectivamente) apresentam uma vimentina com aparência menos nítida, não sendo desejado, portanto. Os resultados com melhor aparência tanto para a vimentina quanto para PrP^C foram os minutos 4 e 5 (FIGURAS 13D e E).

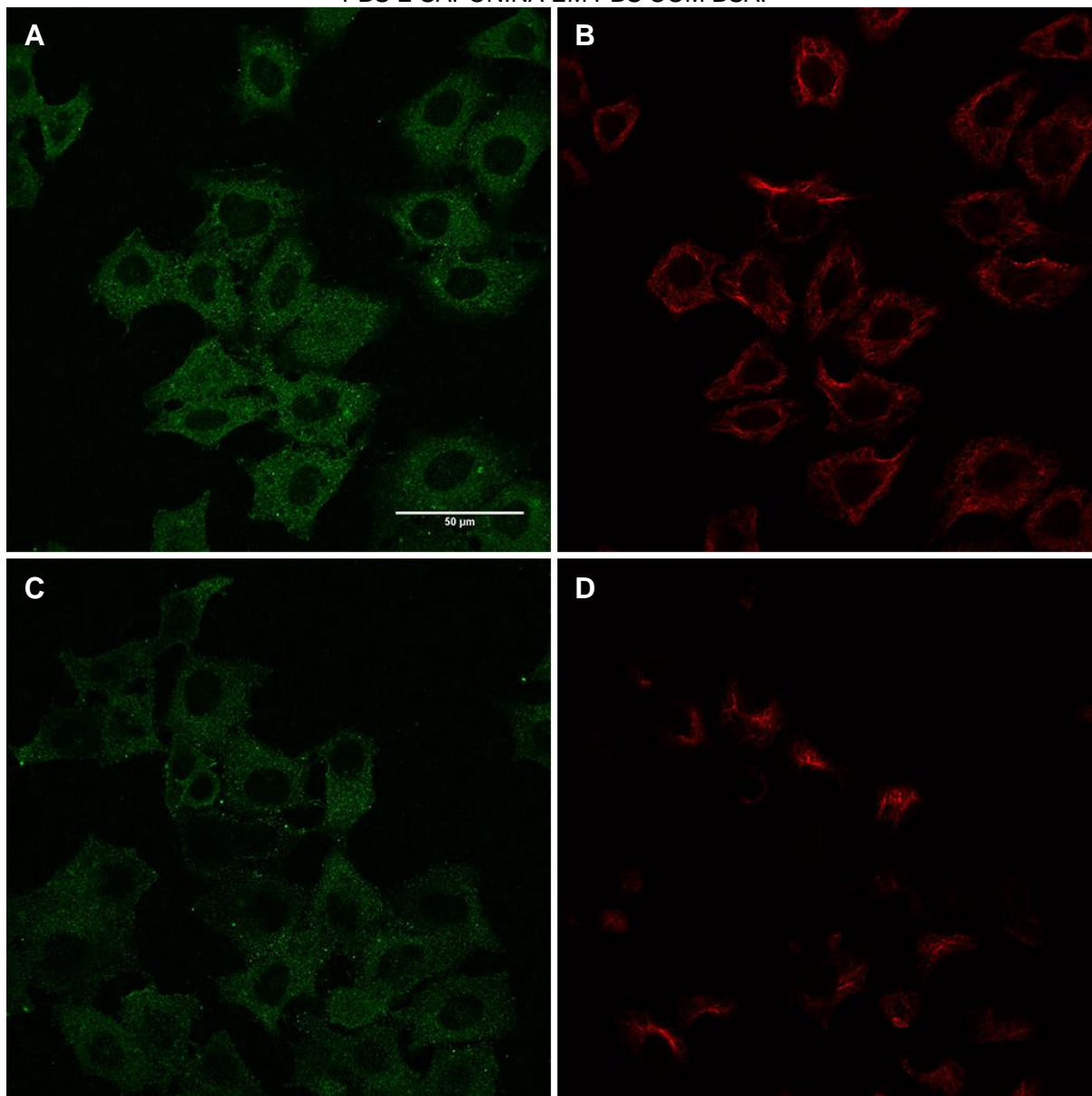
FIGURA 13 – PERMEABILIZAÇÃODE CÉLULAS HELA COM SAPONINA EM PBS DE 1 A 10 MINUTOS.



Permeabilização com saponina 0,01% em PBS nos tempos de 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 7 (F) e 10 minutos (G). PrP^C é mostrado em verde, vimentina em vermelho e núcleo em azul. A barra indica tamanho de 50 µm. FONTE: O autor (2017).

Ao comparar as fluorescências de PrP^C e vimentina dos tempos de 5 minutos dos experimentos de saponina dissolvida apenas em PBS (FIGURAS 14A e B), e saponina em PBS + 5% BSA (FIGURAS 14C e D), podemos ver que nas células permeabilizadas somente com saponina em PBS, a vimentina aparece se estendendo por toda a célula, enquanto no outro experimento, ela aparece apenas em porções desta. Além disso, a marcação em verde de PrP^C (FIGURAS 14A e C) também é relativamente mais nítida quando não há BSA durante a incubação.

FIGURA 14 – COMPARAÇÃO ENTRE AS PERMEABILIZAÇÕES COM SAPONINA SOMENTE EM PBS E SAPONINA EM PBS COM BSA.



Comparação das fluorescências de PrP^C (A e C) e vimentina (B e D) nos experimentos de permeabilização de saponina apenas em PBS (A e B), e saponina em PBS + 5% BSA (C e D), no tempo de 5 minutos. PrP^C é mostrado em verde e vimentina em vermelho. A barra indica tamanho de 50 μ m. FONTE: O autor (2017).

A permeabilização que deu resultados mais condizentes com o desejado foi saponina 0,01% diluída em PBS em contato com as células pelo tempo de 5 minutos.

5.2.2 Padronização da marcação de PrP^C

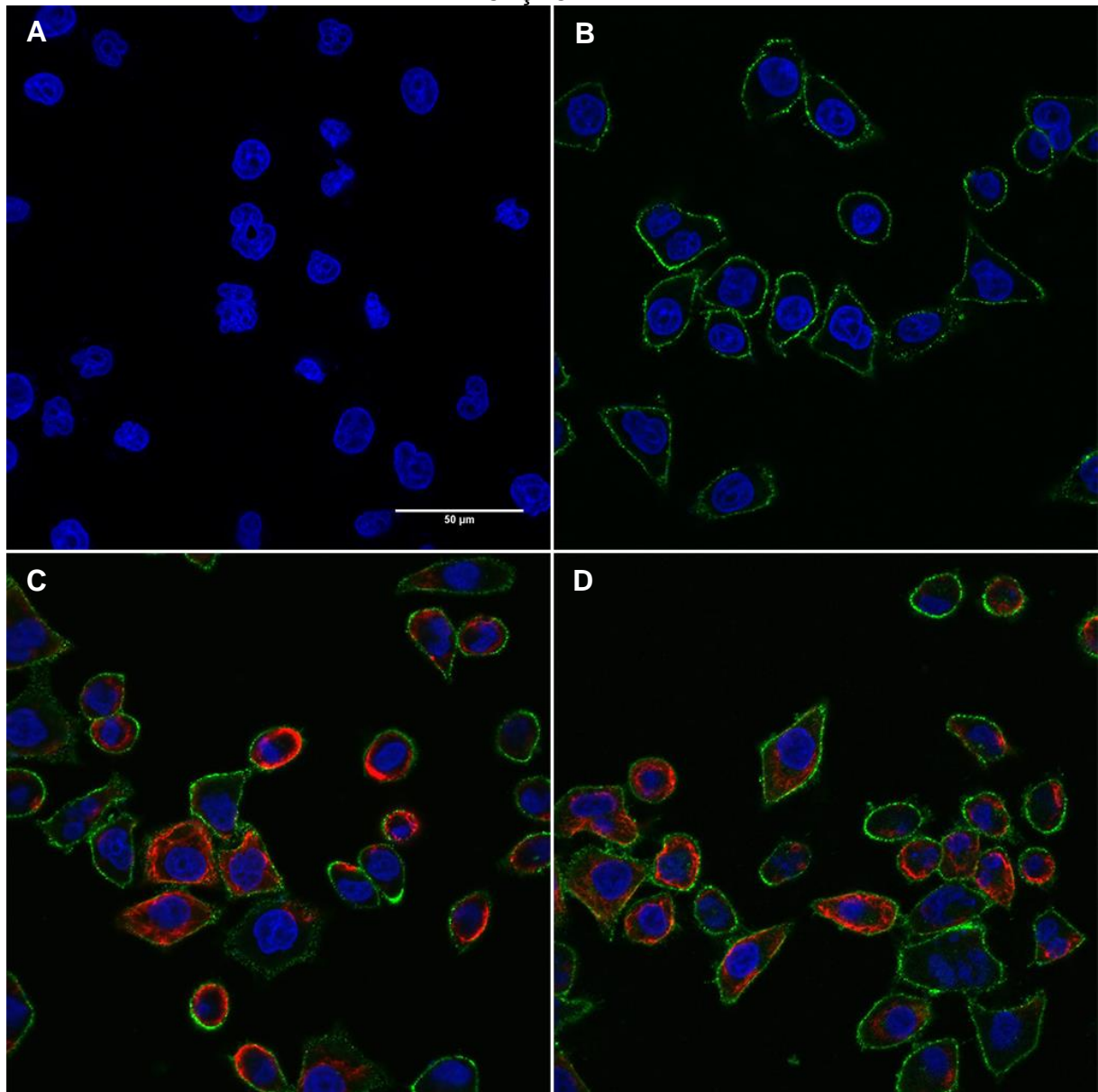
Embora a permeabilização tenha sido padronizada, a marcação de PrP^C ainda poderia ser melhorada, uma vez que parte da fluorescência se encontrava espalhada

pelo citosol celular, quando deveria estar majoritariamente na membrana plasmática das células.

O protocolo descrito no item 4.8.2 apresentava aumento na quantidade de lavagens das células, modificação dos tempos de incubação com os anticorpos primários e secundários, e uma incubação antecipada com anti-PrP antes da fixação das células, de modo a intensificar a marcação na membrana plasmática com as células ainda vivas.

As condições do experimento são mostradas na FIGURA 15. A primeira condição era fazer todo o protocolo de imunofluorescência sem adicionar nenhum anticorpo primário ou secundário à célula, corando-a somente com DAPI, para ver se existia autofluorescência. A célula, felizmente, não apresentou fluorescência própria nem no comprimento de onda de excitação do FITC, nem no do Texas Red (FIGURA 15A). A segunda condição consistia em fazer apenas a primeira incubação com o anticorpo primário anti-PrP, antes de fixar as células, e então incubá-las com paraformaldeído 4%, seguindo diretamente para a incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado ao Alexa 488, sem sequer realizar a permeabilização das células com saponina e posterior bloqueio com BSA. A marcação esperada para essa condição foi atingida, em que se deveria observar PrP^C apenas na membrana, sem que houvesse qualquer fluorescência verde na parte interna da célula (FIGURA 15B). Na terceira condição, foi feita a primeira incubação com anti-PrP, fixação, permeabilização e bloqueio das células normalmente, seguindo para incubação com anticorpo primário anti-vimentina e incubação com os dois anticorpos secundários: anti-IgG de camundongo conjugado ao Alexa 488 e anti-IgG de coelho conjugado ao Texas Red. Tal como esperado, houve forte marcação de PrP^C na membrana e de vimentina na parte interna das células (FIGURA 15C). Na última condição, juntamente com a incubação do anticorpo primário anti-vimentina, foi adicionado anti-PrP novamente, para melhorar a marcação externa e marcar possíveis regiões internas contendo PrP, seguindo depois para os mesmos anticorpos secundários utilizados nas demais condições (FIGURA 15D).

FIGURA 15 – EXPERIMENTOS COM CÉLULAS HELA PARA CERTIFICAR A CORRETA MARCAÇÃO DE PRP.



Condições diversas de marcação com PrP e vimentina em células HeLa. PrP^C é mostrado em verde, vimentina em vermelho e núcleo com DAPI em azul. (A) Células sem anticorpos primários ou secundários. (B) Células reveladas externamente com PrP. (C) Células reveladas externamente com PrP e internamente com vimentina. (D) Células reveladas externamente com PrP e internamente com PrP e vimentina. A barra indica tamanho de 50 µm. FONTE: O autor (2017).

A marcação de PrP e vimentina na última condição (FIGURA 15D) condiz com o esperado para as duas proteínas, estando PrP^C na membrana plasmática da célula (mostrado em verde) e vimentina distribuída ao longo de toda a célula em um padrão fibrilar característico de citoesqueleto (mostrado em vermelho). O resultado da última condição, com marcação interna de PrP, (FIGURA 15D) não se diferenciou grandemente da terceira, somente com marcação externa de PrP, (FIGURA 15C) por

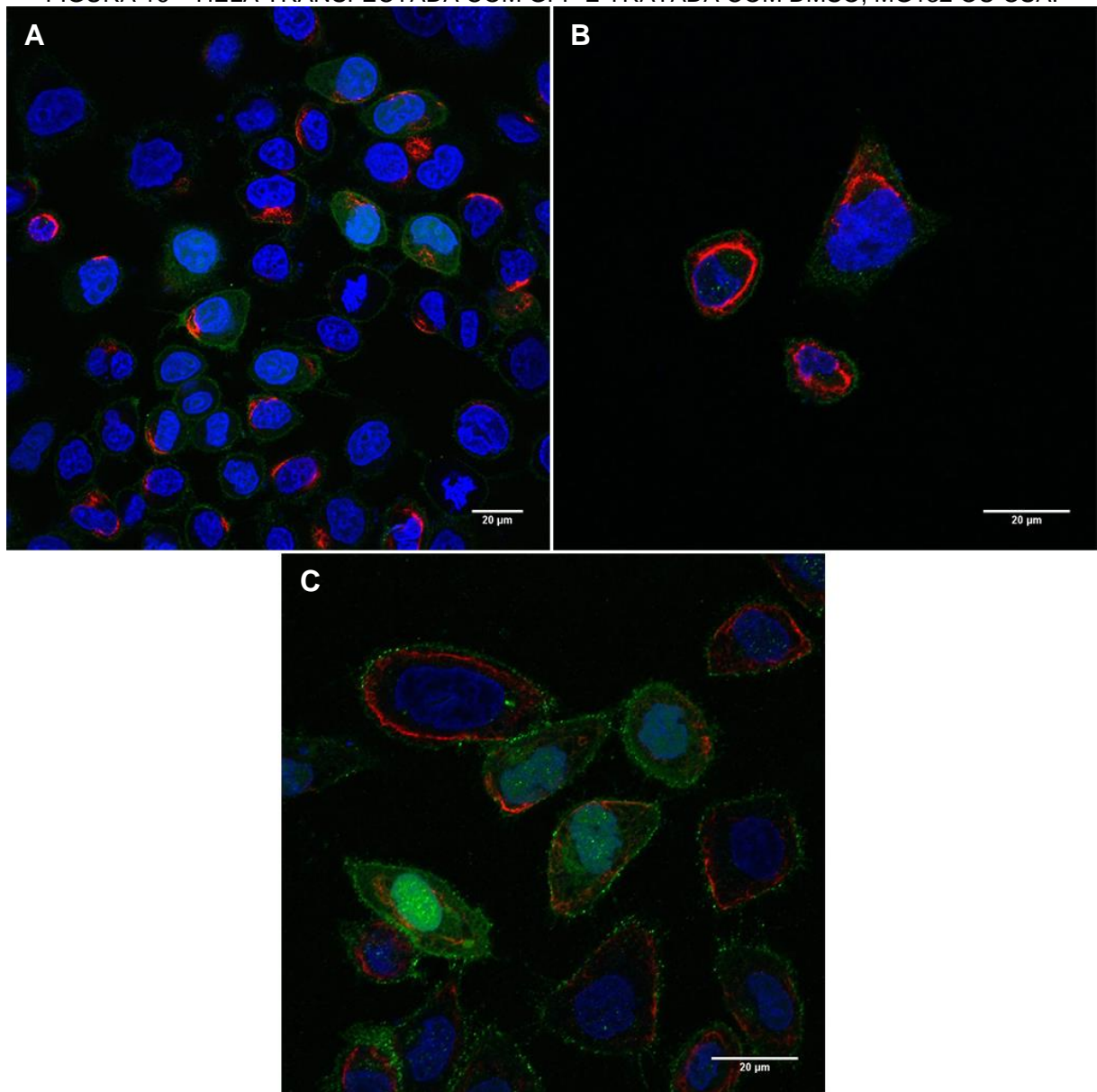
não haver regiões internas com forte marcação de PrP, apresentando apenas marcação de membrana um pouco mais intensa. A segunda incubação com anti-PrP, todavia, será necessária nos próximos experimentos, quando tentaremos demonstrar a formação citosólica de agressomos nas células.

5.2.3 Imunofluorescência de células HeLa

As células HeLa foram transfectadas com os plasmídeos que codificavam para GFP, GFP-PrP^C, GFP-PrP^{Cy}, PrP^C P104L e PrP^C V179I, e tratadas com DMSO, MG132 ou CsA para verificar se diferentes formas e localizações de PrP, em células sob contextos fisiológico, de inibição do proteassoma ou de estresse celular causado pelo dobramento errado de proteínas, seriam capazes de levar à formação de agressomos ou mesmo mudar a aparência das células.

As imagens referentes aos três experimentos são mostradas na FIGURA 16 com GFP, na FIGURA 17 com PrP^C e na FIGURA 18 com PrP^{Cy}.

FIGURA 16 – HELA TRANSFECTADA COM GFP E TRATADA COM DMSO, MG132 OU CSA.



Células HeLa transfectadas com GFP e tratadas com DMSO (A), MG132 (B) ou CsA (C). PrP^C é mostrado em verde, vimentina em vermelho e o núcleo é corado em azul com DAPI. Há fluorescência verde no núcleo possivelmente por ação da ciclosporina. As barras indicam tamanho de 20 µm. FONTE: O autor (2017).

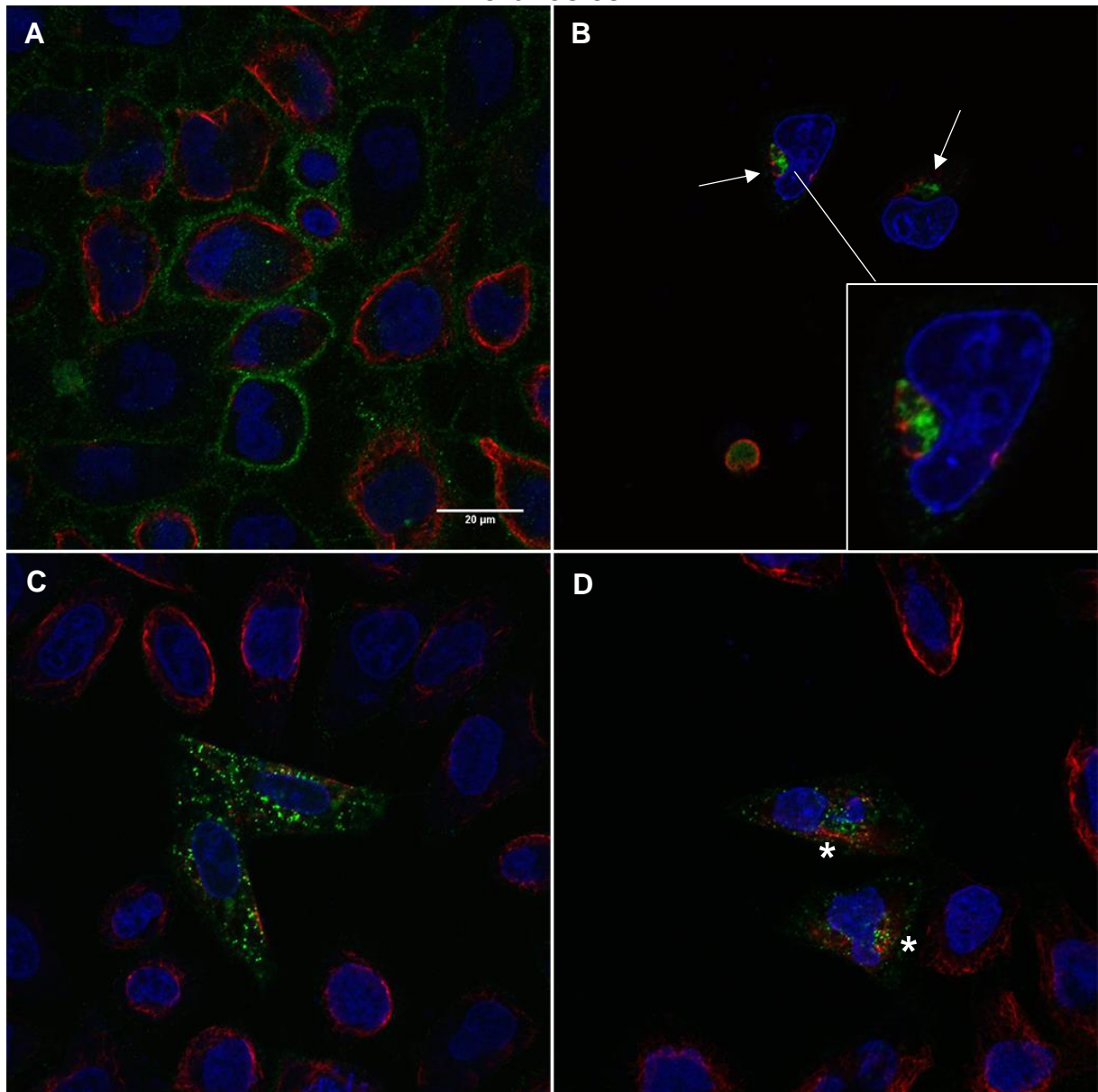
Embora não tenhamos usado anticorpos anti-GFP para revelar com maior precisão o efeito de sua presença na célula e sua localização, podemos tomar alguns parâmetros celulares gerais para descrever o que acontece em cada experimento. Na FIGURA 16A, as células foram transfectadas com GFP e tratadas apenas com DMSO. Os núcleos das células de uma maneira geral parecem ter formas normais, tomando como exemplo a FIGURA 15D, e embora o citoesqueleto de vimentina não apareça distendido por toda a célula, não se nota nenhuma anomalia muito proeminente em sua localização.

Entretanto, na FIGURA 16B, em que as células foram tratadas com MG132, detecta-se algumas modificações. Nas três células mostradas, pode-se ver que o núcleo se encontra um pouco deformado, aparentando como se estivesse sendo pressionado por alguma outra estrutura. Além disso, nota-se claramente que o citoesqueleto de vimentina parece formar um círculo em torno do núcleo, formando uma espécie de contenção. Apesar de não ser possível afirmar com certeza devido ao não uso de anticorpos anti-GFP, essas evidências apontadas sugerem fortemente a formação de um agressomo composto por GFP.

Na FIGURA 16C, a forma das células, de seus núcleos e de seu citoesqueleto parecem semelhantes ao tratamento com DMSO. O que percebemos, contudo, é a presença de fluorescência verde no núcleo. Não sabemos se essa fluorescência é proveniente de PrP ou se trata-se de marcação inespecífica, mas o que pudemos perceber é que parece ser um efeito secundário ao tratamento com a ciclosporina A.

Na FIGURA 17 fez-se experimento semelhante, mas transfectando as células com plasmídeo que codifica para PrP^C. Novamente, a FIGURA 17A mostra as células tratadas apenas com DMSO, a FIGURA 17B mostra as células tratadas com MG132, e as FIGURAS 17C e D mostram o tratamento com CsA.

FIGURA 17 – CÉLULAS HELA TRANSFECTADAS COM GFP-PRP^C E TRATADAS COM DMSO, MG132 OU CSA.



Células HeLa transfetadas com GFP-PrP^C e tratadas com DMSO (A), MG132 (B) ou CsA (C e D). PrP^C é mostrado em verde, vimentina em vermelho e núcleo com DAPI em azul. Em (B) é possível observar a formação de agregados no tratamento com MG132 (flechas). Na figura C vemos concentração de parte da fluorescência verde próxima aos núcleos das células (asteriscos). A barra indica tamanho de 20 μm. FONTE: O autor (2017).

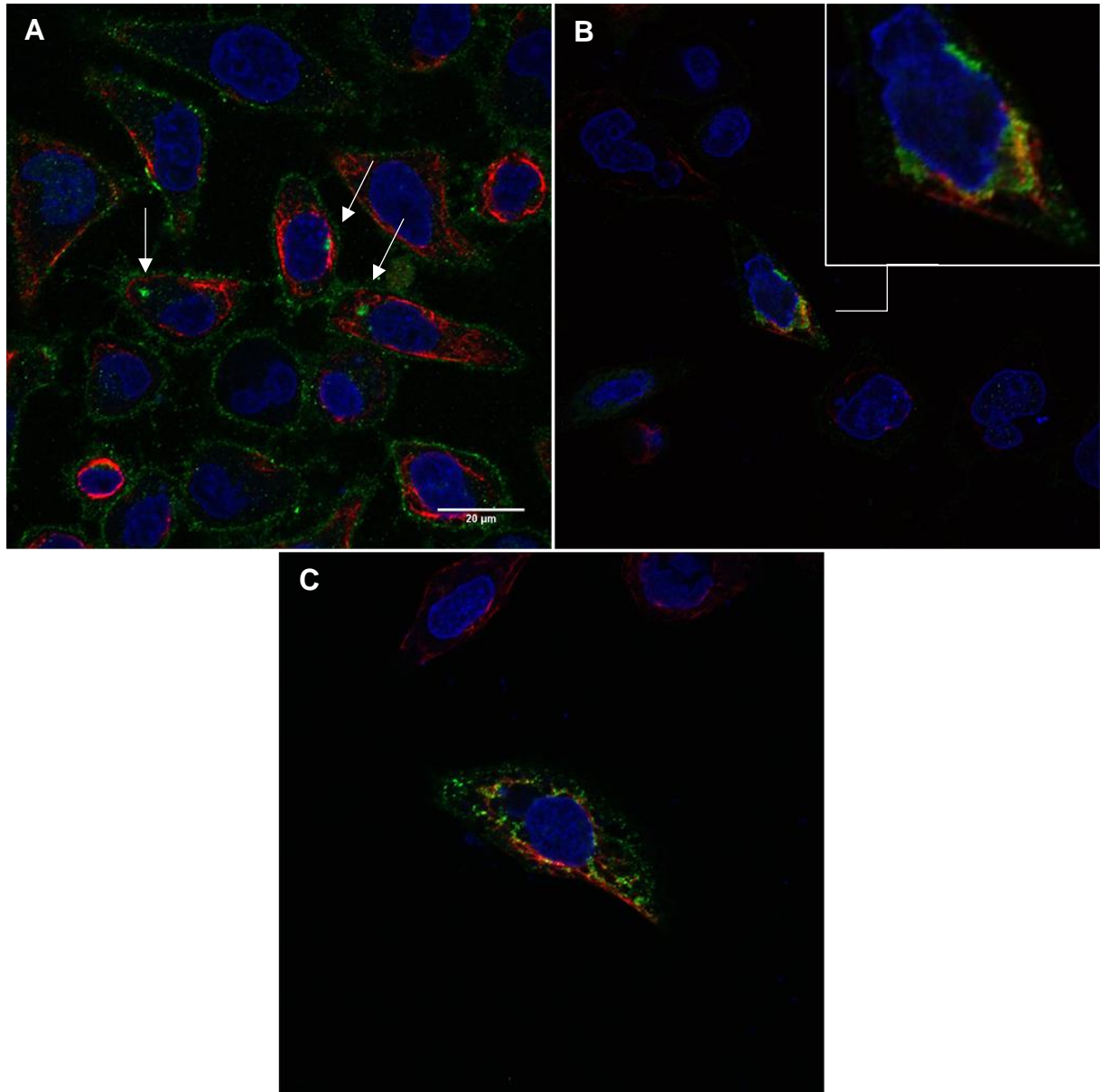
No centro da FIGURA 17A vemos algumas células transfetadas com PrP^C que se diferenciam das não-transfetadas pela intensidade de fluorescência verde na membrana plasmática. A superexpressão de PrP^C leva a um aumento de sua quantidade na membrana plasmática, mas não é capaz de levar à formação de agregados ou mesmo de alterar as características morfológicas da célula quando em tratamento apenas com DMSO, uma vez que tanto a marcação de PrP^C quanto de vimentina parecem normais.

A FIGURA 17B, por outro lado, indica que o tratamento com MG132 leva à formação de agregados de PrP (apontados por flechas) que se localizam próximos ao núcleo celular e são envoltos por fluorescência vermelha provinda do citoesqueleto de vimentina. A presença dessas estruturas gera leve deformação no núcleo das células, que parecem pressionados contra os agregados. As estruturas apontadas assemelham-se morfológicamente a agressomos, e seu contexto de formação, por inibição do proteassoma, também coincide com uma das vias de formação dos mesmos. Nessa figura não é possível ver a fluorescência das membranas plasmáticas dessas células por termos diminuído a intensidade da fluorescência verde durante a captura das imagens. Como a fluorescência verde nos agregados estava altamente saturada, reduzimos sua intensidade até retirar totalmente a saturação para que pudéssemos ver claramente a estrutura, sem sermos enganados com falsas co-localizações oriundas da fluorescência excessiva.

As FIGURAS 17C e D mostram o que acreditamos ser estágios diferentes de uma mesma resposta. Na FIGURA 17C podemos ver a presença de fluorescência verde em agregados pontuais, cujas localizações encontram-se difusas no citosol da célula. Essas fluorescências não parecem influenciar a localização do citoesqueleto de vimentina, pois este não está concentrado em nenhuma região específica da célula. Ao olharmos para a FIGURA 17D vemos o que parece ser uma mistura de respostas. É possível observar parte do evento da FIGURA 17C, com pequenos pontos de fluorescência espalhados no citosol celular, mas também vemos uma resposta semelhante à da FIGURA 17B, com agregados de fluorescência verde (apontados por asteriscos) próximos ao núcleo celular e acompanhados de um entorno de citoesqueleto de vimentina. A fluorescência verde de algumas células nas FIGURAS 17C e D não podem ser vistas pelo mesmo motivo de saturação de fluorescência que citamos anteriormente.

Ainda em experimento semelhante aos dois anteriores, a FIGURA 18 mostra as células transfectadas com plasmídeo que codifica para GFP-PrP_{cy}, tratadas com DMSO, MG132 ou CsA.

FIGURA 18 – CÉLULAS HELA TRANSFECTADAS COM PRPCY E TRATADAS COM DMSO, MG132 OU CSA.



Células HeLa transfetadas com GFP-PrPcy e tratadas com DMSO (A), MG132 (B) ou CsA (C). PrP^C é mostrado em verde, vimentina em vermelho e núcleo com DAPI em azul. A figura A mostra células com agregados citosólicos de PrP (flechas), indicando que a localização da proteína em condições fisiológicas está correta. A barra indica tamanho de 20 µm. FONTE: O autor (2017).

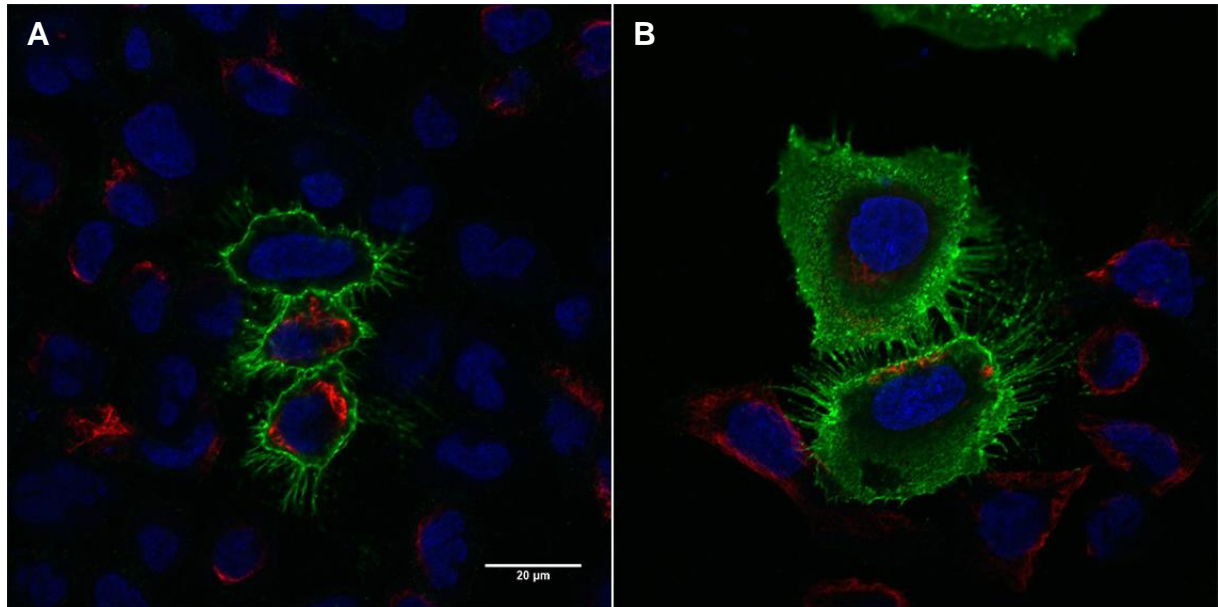
A proteína codificada GFP-PrPcy, por não possuir o peptídeo sinal de endereçamento para o retículo endoplasmático, acaba não seguindo a via canônica de síntese de PrP, ficando presa no citosol celular. Na FIGURA 18A, em que as células são transfetadas e tratadas apenas com DMSO, vemos um exemplo da localização dessa proteína, formando pequenos grupamentos no citosol da célula (apontado por flechas). A expressão de PrPcy por si só não parece promover a formação de

agressomos nem muito menos perturbar a disposição do citoesqueleto de vimentina, que apresenta sua forma fibrilar característica.

Quando tratamos as células com MG132 (FIGURA 18B), todavia, percebemos que os agregados proteicos se tornam maiores e com maior concentração de proteína, fato que foi observado devido ao aumento na intensidade da fluorescência verde no momento da captura das imagens, além de co-localizar com a proteína vimentina (pontos amarelos na imagem indicam sobreposição dos canais de cor verde e vermelho, e portanto, co-localização). Entretanto, diferentemente das células transfectadas com PrP^C, essas células não demonstraram formação de estruturas semelhantes a agressomos. O que vemos são diversos focos de acúmulo ao torno do núcleo, mas sem um padrão aparente de organização.

No tratamento das células com CsA (FIGURA 18C) também não é possível ver a formação de agressomos típicos, mas sim agregados citosólicos sem grau de organização, todavia, a localização desses agregados diferem do tratamento com MG132. No tratamento anterior, os agregados encontravam-se concentrados ao redor do núcleo em estruturas maiores, já no tratamento com CsA eles encontram-se difusos no citosol celular, co-localizando aleatoriamente com o citoesqueleto de vimentina.

Em outro experimento de imunofluorescência com as células HeLa, testou-se a transfecção com mutantes de PrP para as doenças GSS e CJD, usando plasmídeos com mutações nos aminoácidos P104L e V179I, respectivamente. Devido às mutações nesses aminoácidos, as proteínas sintetizadas são constitutivamente mal dobradas, devendo gerar resposta semelhante ao tratamento com CsA. Para este experimento, testamos as transfecções das células com e sem posterior tratamento com CsA (o tratamento com ciclosporina serviria no caso para intensificar o grau de mal dobramento das proteínas). Os resultados são mostrados na FIGURA 19. Como os experimentos das transfecções com e sem tratamento com CsA tiveram resultados iguais, serão mostradas apenas as figuras referentes às células sem tratamento, por elas estarem mais nítidas.

FIGURA 19 – HELA TRANSFECTADA COM PRP^C P104L E V179I.

Células HeLa transfetadas com PrP^C P104L (A) ou V179I (B). PrP^C é mostrado em verde, vimentina em vermelho e núcleo com DAPI em azul. Em ambas as figuras é possível ver a formação de estruturas que lembram filopódios e que parecem se direcionar para células adjacentes. A barra indica tamanho de 20 µm. FONTE: O autor (2017).

Ambas as transfecções, tanto com P104L (FIGURA 19A) quanto com V179I (FIGURA 19B), apresentaram resultados inesperados. Além de não haver a formação de agressomos, ou mesmo de agregados citosólicos pontuais, tal como foi visto nos experimentos anteriores, as células desenvolveram estruturas de membrana semelhantes a filopódios. Esses pareciam se estender de uma célula a outra, como se estivessem conectando-as, e embora não fossem acompanhados pela vimentina, não podemos excluir a possibilidade de eles serem formados em conjunto com outras proteínas de citoesqueleto. Além disso, a fluorescência emitida por essas células era muito maior do que a emitida pelas células adjacentes, demonstrando alto grau de expressão de PrP. Curiosamente, essas células com alta expressão de PrP e com essas estruturas de membrana apareciam sempre em conjuntos, e nunca isoladas. O motivo da formação dessas estruturas semelhantes a filopódios e o desencadeamento dessa resposta não foram investigados mais a fundo.

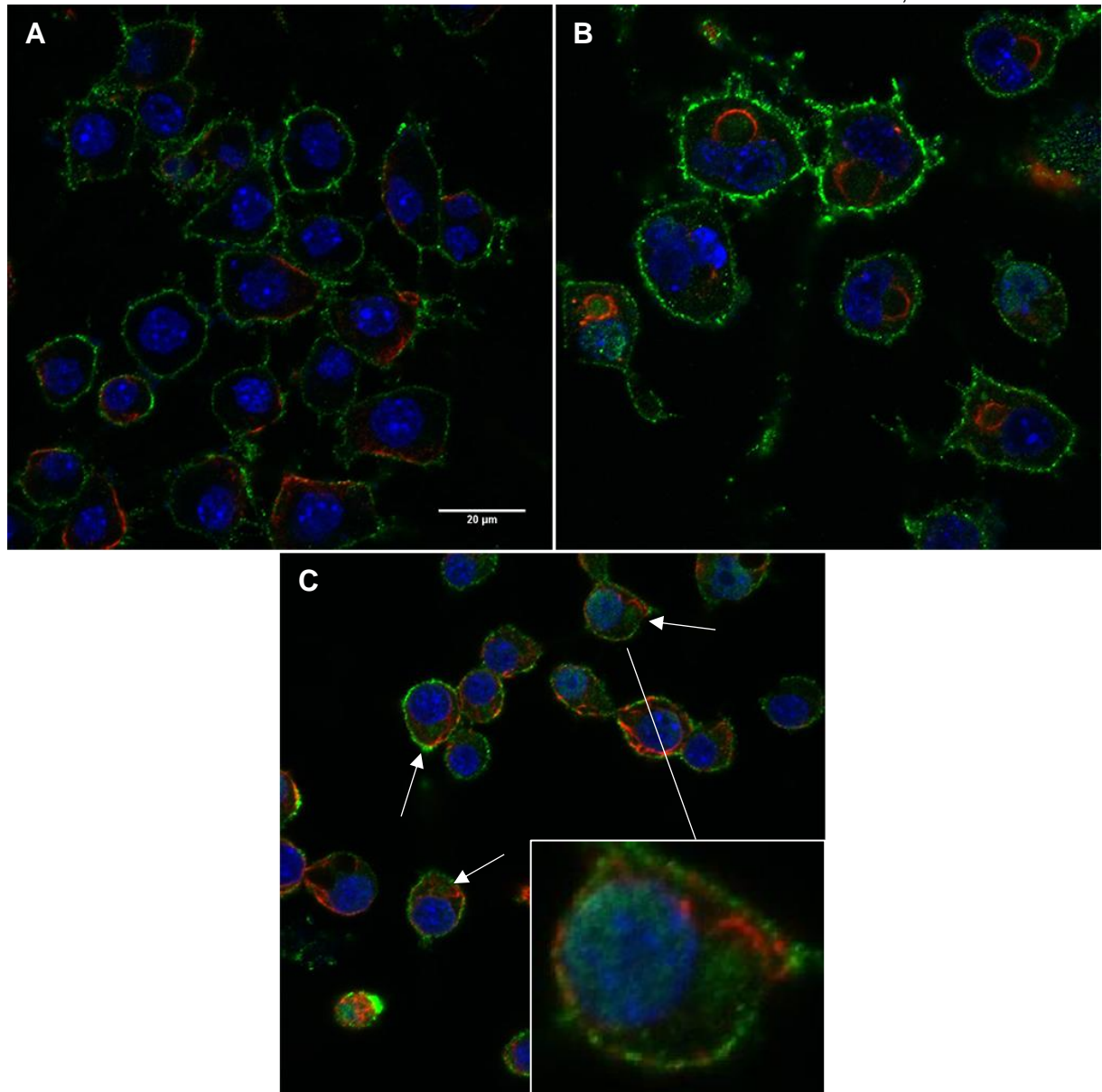
5.2.4 Imunofluorescência de células N2a

Após evidenciarmos a presença de agressomos nas células HeLa sob algumas condições, queríamos ver se esses agressomos também seriam formados nas células neuronais N2a, fornecendo assim um modelo mais real do que aconteceria

numa possível infecção com PrP^{Sc} ou mesmo em condições celulares que favorecessem a formação da isoforma *scrapie*. Para isso, as células N2a foram deixadas sem transfecção, ou transfectadas com plasmídeos que expressavam GFP, GFP-PrP^C, GFP-PrP^{Cy}, PrP^C P104L e V179I, e tratadas com DMSO, MG132 ou CsA.

Primeiramente, a FIGURA 20 mostra os resultados obtidos nas imunofluorescências com células N2a não transfectadas.

FIGURA 20 – CÉLULAS N2A NÃO TRANSFECTADAS E TRATADAS COM DMSO, MG132 OU CSA.



Células N2a não transfectadas e tratadas com DMSO (A), MG132 (B) ou CsA (C). PrP^C é mostrado em verde, vimentina em vermelho e o núcleo corado em azul com DAPI. Nas figuras B e C (flechas) é possível ver a formação de agressomos. A barra indica tamanho de 20 μm. FONTE: O autor (2017).

A FIGURA 20A apresenta células N2a em sua forma fisiológica, sem transfecção de nenhum plasmídeo e tratadas apenas com DMSO, que serve como

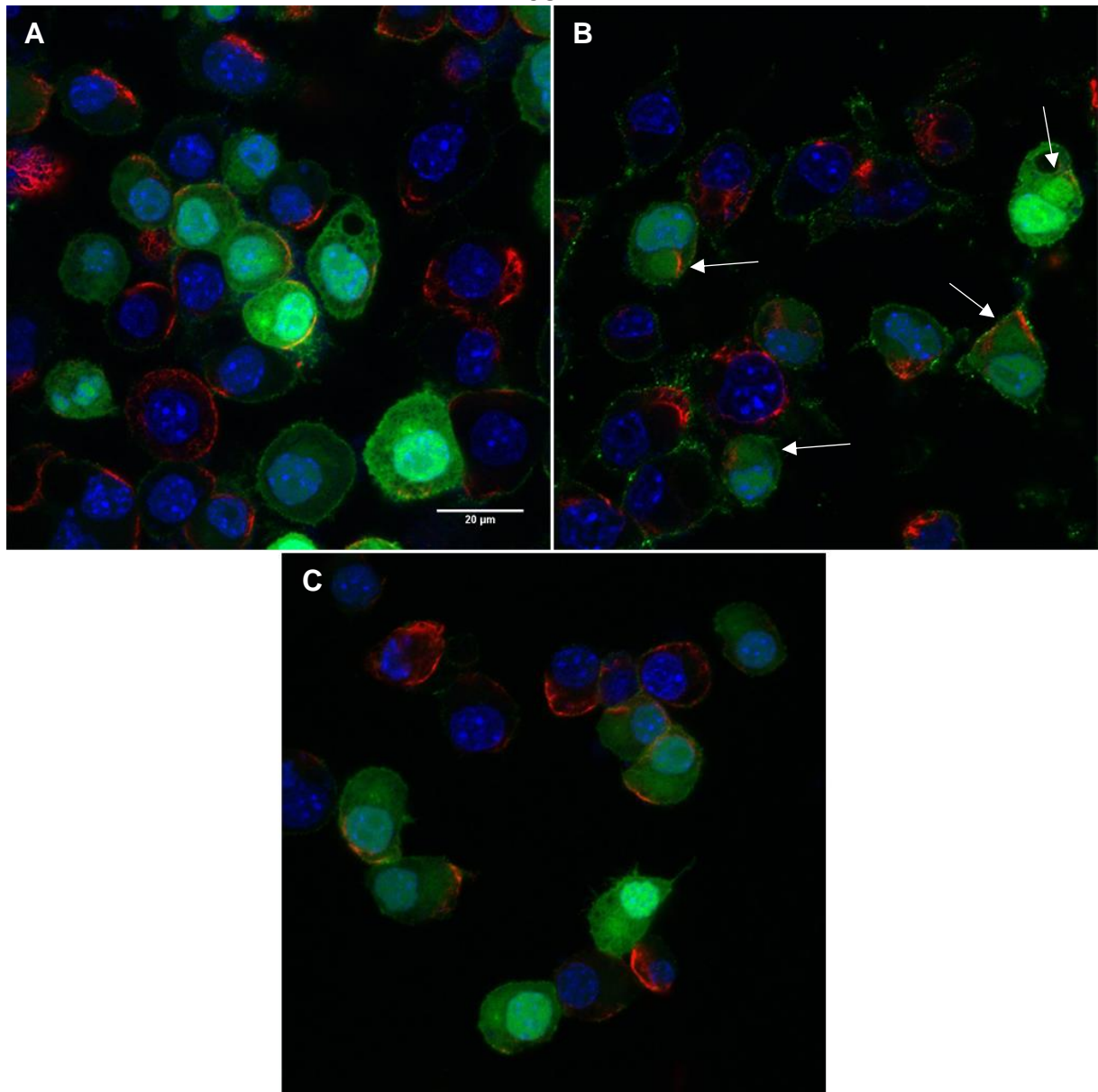
um controle negativo por ser o veículo do MG132. Podemos ver que PrP^C (mostrado em verde nas figuras) se localiza inteiramente na membrana plasmática das células, sem formar nenhum agregado citosólico. Além disso, é possível ver a localização do citoesqueleto de vimentina, mostrado em vermelho.

Quando as células são tratadas com MG132 (FIGURA 20B) é possível visualizar a formação de pequenos pontos verdes no citosol celular e também a formação de agressomos em sua estrutura típica. Esses agressomos, como mostrado anteriormente, localizam-se próximo ao núcleo da célula, podendo inclusive deformá-lo, apresentam agregação proteica em seu centro, e citoesqueleto de vimentina em seu entorno. Em N2a, diferentemente das células HeLa, os agressomos apresentam-se em maior número de células e mais nítidos. Inclusive, em células HeLa, não havia sido detectada a presença dos agressomos em células não transfectadas.

Na FIGURA 20C, em que as células N2a são tratadas com CsA, vemos as células com o citosol pontilhado com fluorescência verde, tal como foi visto anteriormente em HeLa, mas dessa vez observa-se a formação de alguns agressomos nas células (apontados por flechas). Embora estejam mais fracos e em menor quantidade do que nas células tratadas com MG132, a estrutura com fluorescência verde acumulada no centro e envolta com citoesqueleto vermelho ainda pode ser observada.

Seguimos para a FIGURA 21, que mostra as células N2a transfectadas com GFP.

FIGURA 21 – CÉLULAS N2A TRANSFECTADAS COM GFP E TRATADAS COM DMSO, MG132 OU CSA.



Células N2a transfetadas com plasmídeo que codifica para GFP e tratadas com DMSO (A), MG132 (B) ou CsA (C). PrP^C é mostrado em verde, vimentina em vermelho e o núcleo corado em azul com DAPI. Na figura B é possível ver a formação de agregados (flechas). A barra indica tamanho de 20 µm. FONTE: O autor (2017).

Na FIGURA 21A vemos a fluorescência de GFP se espalhando por todo o citosol da célula e também para o núcleo desta. Assim, é fácil perceber a diferença entre as células que foram transfetadas, das que não o foram. Olhando as células transfetadas, parece haver a formação de alguns aglomerados de fluorescência verde no citosol das células, mas não foi possível afirmar se estes agregados tratam-se de agregados por três motivos: os núcleos das células não parecem deslocados,

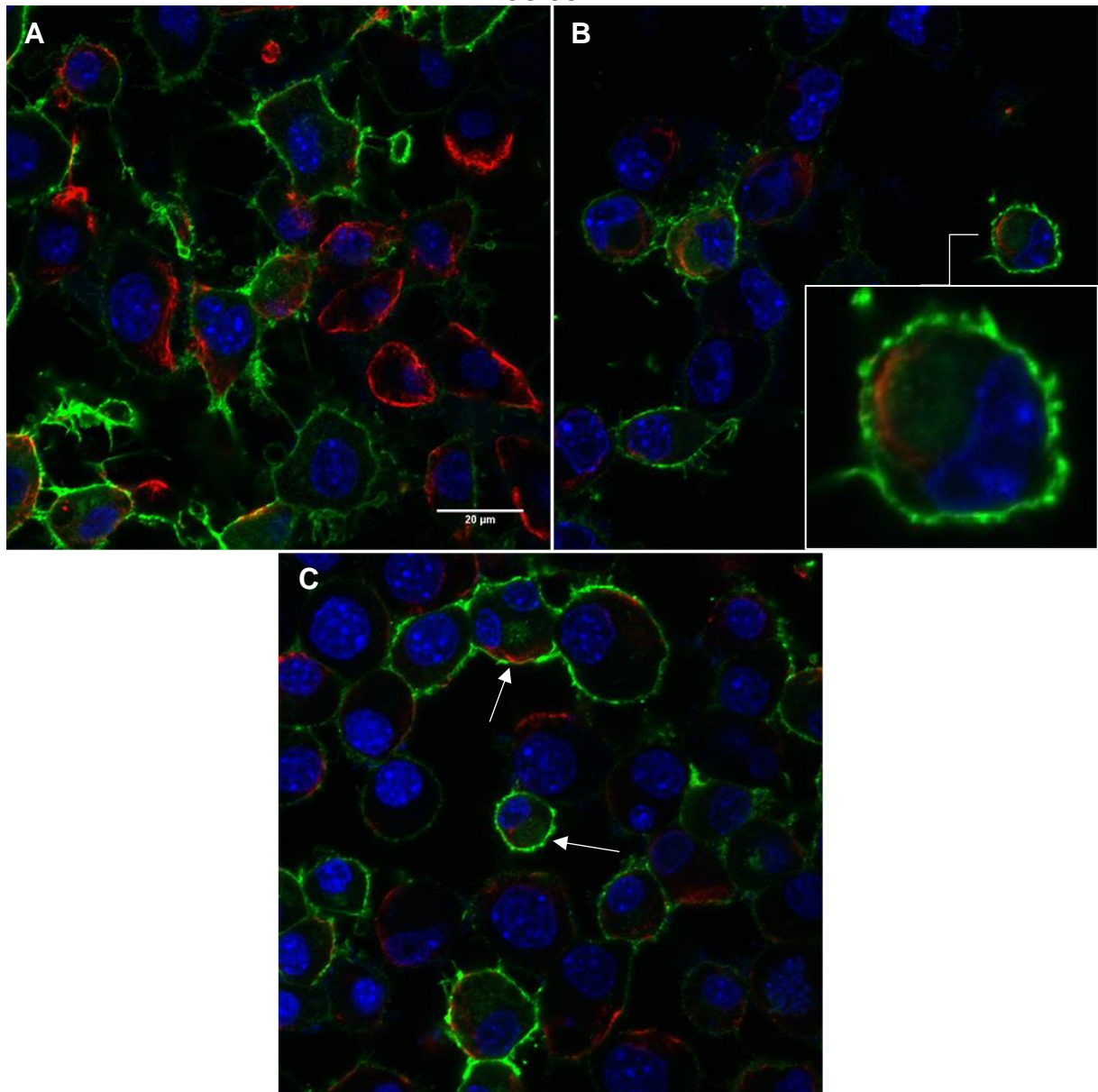
não há citoesqueleto de vimentina envolvendo esses concentrados de fluorescência, a localização desses pontos não está próxima o suficiente do núcleo.

No tratamento com MG132 (FIGURA 21B), podemos observar a formação de alguns agressomos nas células transfectadas (apontados por flechas), embora também existam agressomos nas células não transfectadas. Como não testamos as células com anticorpos anti-GFP, não é possível diferenciar se os agressomos são formados por GFP ou por PrP^C endógeno, tal como acontece na FIGURA 20B.

Quando as células foram tratadas com CsA (FIGURA 21C) não pôde-se observar nitidamente a presença de agressomos. Embora algumas células apresentem regiões um pouco mais fluorescentes no citosol, não é possível afirmar que esses pontos são agressomos, pelos mesmos motivos descritos anteriormente. As fluorescências citosólicas que aparecem na FIGURA 21C se assemelham mais à condição com DMSO do que a com MG132.

O experimento com as células N2a transfectadas com PrP^C é mostrado na FIGURA 22.

FIGURA 22 – CÉLULAS N2A TRANSFECTADAS COM PRP^C E TRATADAS COM DMSO, MG132 OU CSA.



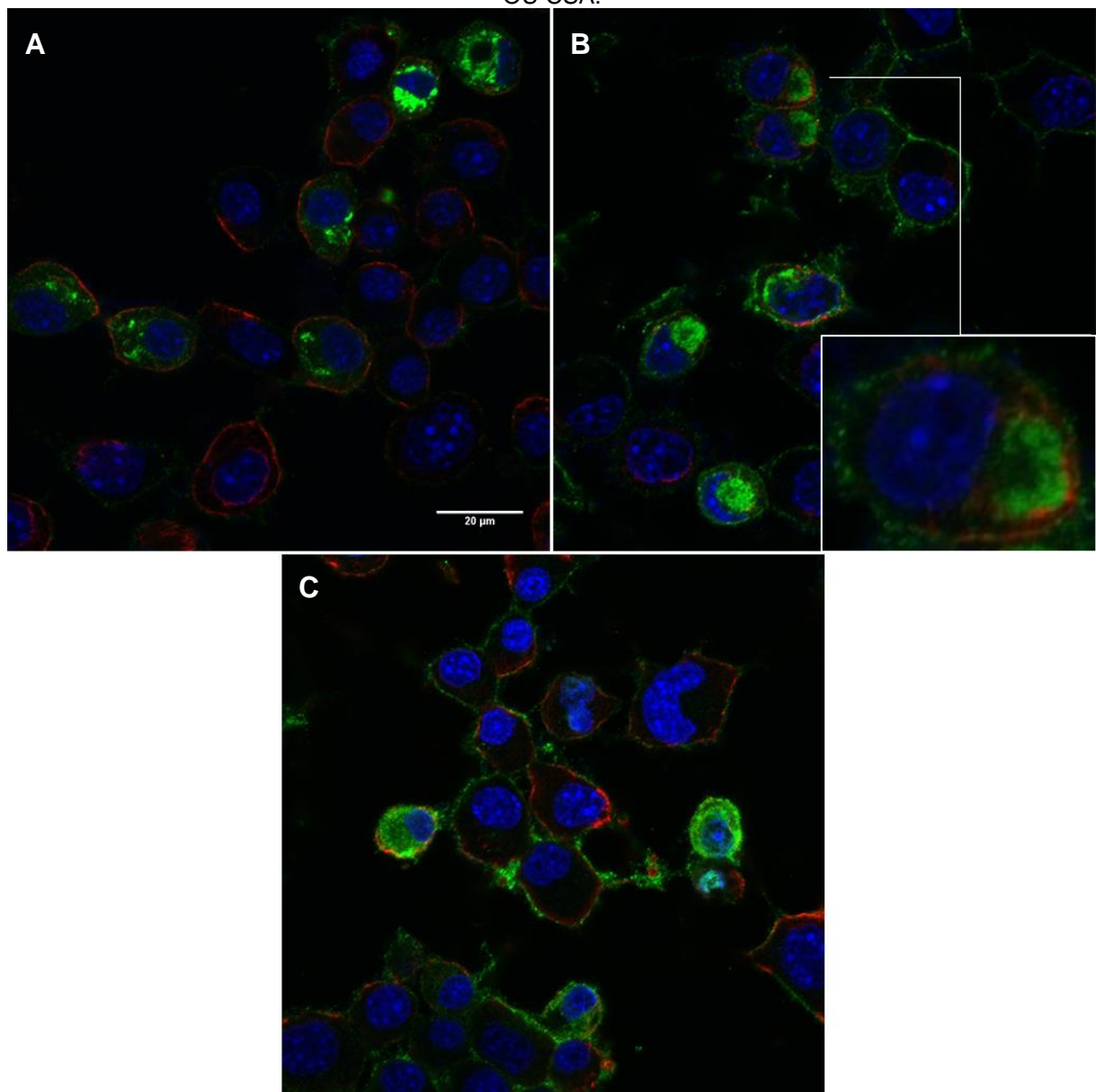
N2a transfetadas com plasmídeo que expressa PrP^C e tratadas com DMSO (A), MG132 (B) ou CSA (C). PrP^C é mostrado em verde, vimentina em vermelho e o núcleo corado em azul com DAPI. As células transfetadas apresentam maior fluorescência em suas membranas plasmáticas. Na figura C, alguns possíveis agressomos são apontados por flechas. A barra indica tamanho de 20 µm. FONTE: O autor (2017).

É possível distinguir as células transfetadas com PrP^C daquelas que não o foram através da intensidade da fluorescência na membrana plasmática. Ao olharmos para a FIGURA 22A vemos que algumas células são muito mais fluorescentes que as demais, indicando que essas estão superexpressando PrP^C, mas isso por si só não é suficiente para gerar formação de agressomos quando em tratamento apenas com DMSO.

Tanto na FIGURA 22B quanto na FIGURA 22C vemos a formação de agressomos (na última, eles estão apontados por flechas). No tratamento com MG132 eles aparecem também nas células não-transfectadas, provavelmente por consequência do PrP^C endógeno, enquanto no tratamento com CsA os vemos apenas nas células com fluorescência aumentada.

Na FIGURA 23 são mostradas as imagens obtidas das células transfectadas com a forma citosólica da proteína prion.

FIGURA 23 – CÉLULAS N2A TRANSFECTADAS COM PRPCY E TRATADAS COM DMSO, MG132 OU CSA.



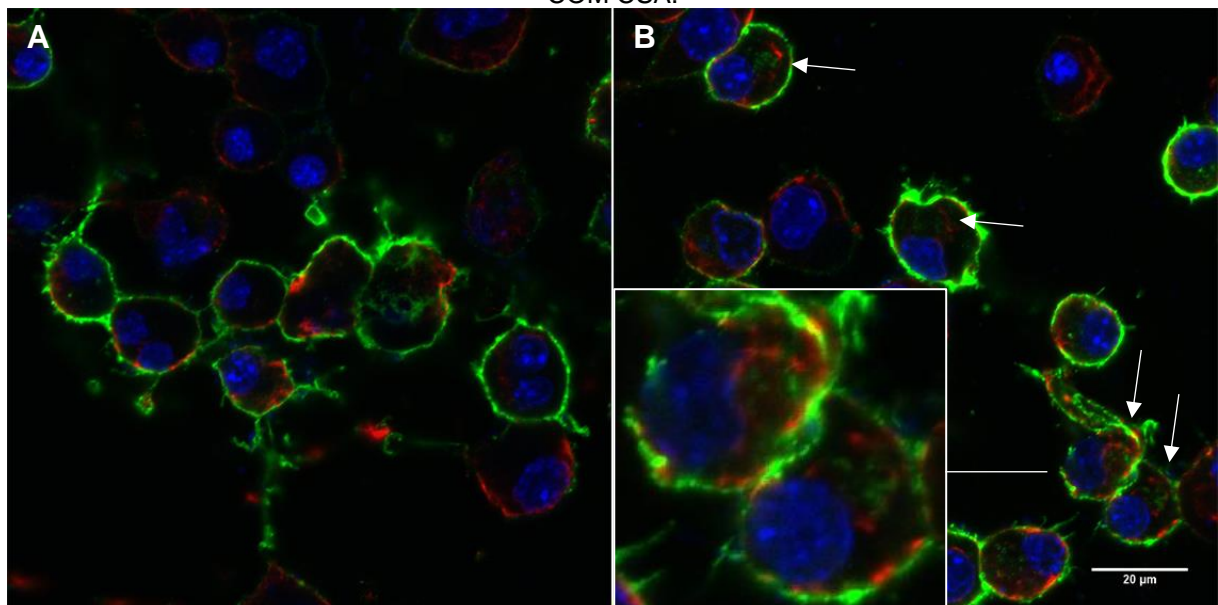
N2a transfectadas com plasmídeo que expressa PrPcy e tratadas com DMSO (A), MG132 (B) ou CsA (C). PrP^C é mostrado em verde, vimentina em vermelho e o núcleo corado em azul com DAPI. A barra indica tamanho de 20 μm. FONTE: O autor (2017).

É possível notar a formação de agregados citosólicos nas células que foram transfectadas com PrP^{Cy} na FIGURA 23A. Esses agregados ficam dispersos pelo citoplasma, sem se armazenarem em regiões específicas, e o grau de expressão de PrP^{Cy} pode ser avaliado pela quantidade de fluorescência emanada do citosol celular. Como foi mencionado no experimento com células HeLa, não é possível ver a membrana plasmática dessas células pois a intensidade de fluorescência verde foi reduzida no momento da captura das imagens pelo fato de as células estarem com fluorescência saturada em seu citosol.

Novamente, quando em tratamento com MG132 (FIGURA 23B) é possível observar a formação de agressomos tanto nas células transfectadas com PrP^{Cy} quanto nas sem transfecção. Algumas células mostram fluorescência bem intensa dentro do agressomo formado, enquanto em outras sequer é possível enxergar o acúmulo de proteína dentro deste. Apesar disso, não podemos afirmar que a maior intensidade de fluorescência provém da proteína de fusão GFP-PrP^{Cy}. Já nas células tratadas com CsA não foi possível observar agressomos em nenhuma das células, muito embora existam células transfectadas nos campos analisados.

Por fim, a FIGURA 24 mostra as células N2a transfectadas com os plasmídeos que expressam PrP^C P104L e V179I.

FIGURA 24 – N2A TRANSFECTADAS COM PRP^C MUTADOS EM P104L E V179I E TRATADAS COM CSA.



Células N2a transfectadas com plasmídeo que expressa PrP^C P104L (A) e V179I (B) e tratadas com CsA. PrP^C é mostrado em verde, vimentina em vermelho e o núcleo corado em azul com DAPI. Na figura B é possível ver a formação de algumas estruturas que lembram agressomos (flechas). A barra indica tamanho de 20 μm. FONTE: O autor (2017).

Como o tratamento das células transfectadas com CsA em HeLa não alterou o resultado obtido, decidimos tratar também as células N2a para intensificar possíveis efeitos ocasionados pelo mal dobramento das proteínas expressas. Diferentemente das células HeLa, em N2a a transfecção com os plasmídeos que codificam para PrP^C P104L e V179I não levaram à formação de filopódios nas células. As proteínas expressas, apesar de serem mal dobradas, pareceram se deslocar normalmente para a membrana da célula, o que pode ser visto devido ao aumento da fluorescência da mesma. Entretanto, é possível notar uma diferença entre os resultados obtidos para os dois plasmídeos. Enquanto na transfecção com P104L não foi possível observar a formação de nenhum agressomo ou mesmo de agregados citosólicos, na transfecção com V179I pudemos evidenciar diversos agressomos formados nas células transfectadas (apontados por flechas). Embora os agressomos não estejam tão nítidos quanto nos tratamentos com MG132, sua quantidade nas células, mesmo sem o inibidor de proteassoma, é maior do que nos demais tratamentos com a ciclosporina.

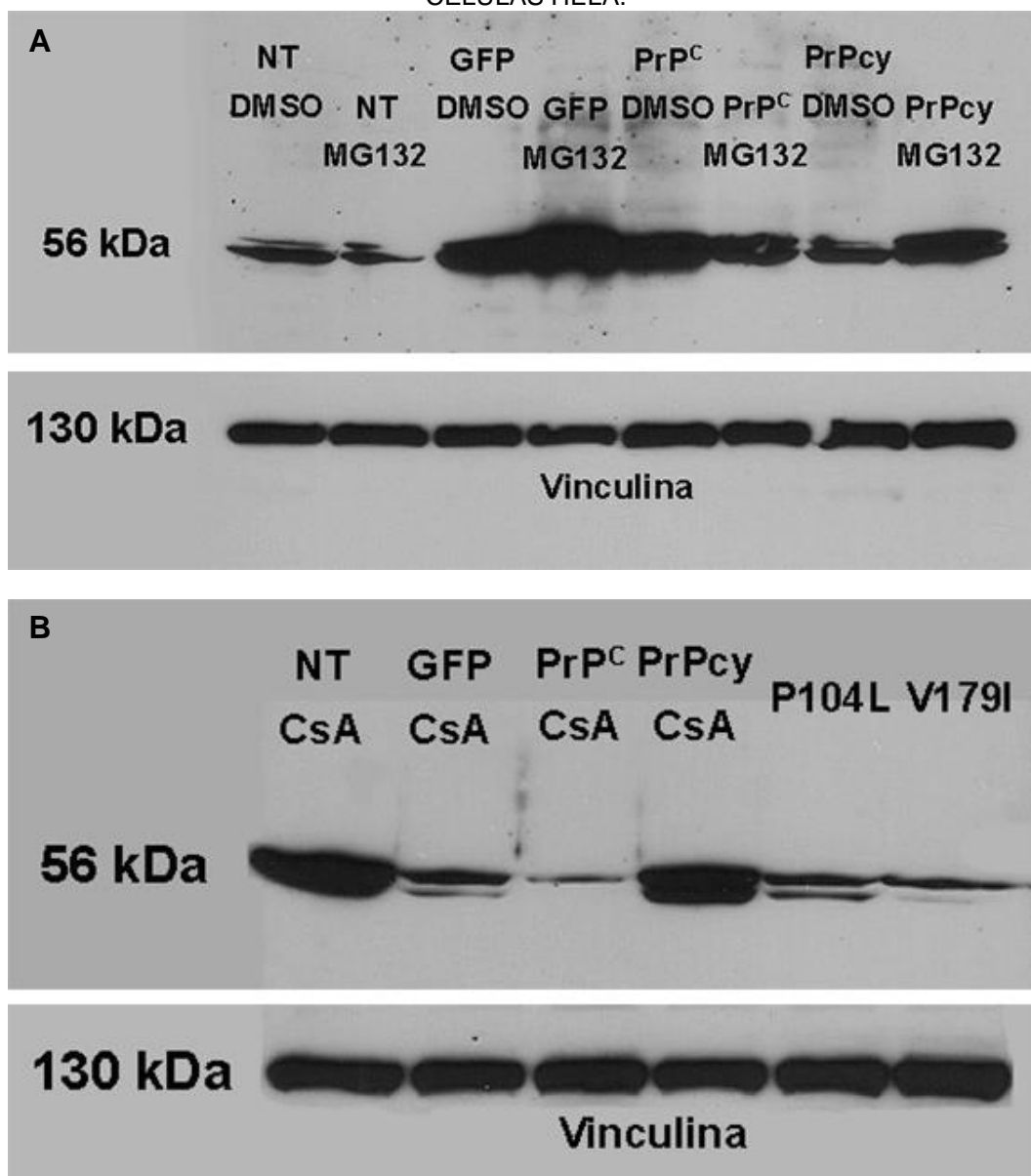
5.3 QUANTIFICAÇÃO DA VIMENTINA SOB DIVERSOS TRATAMENTOS

Hartmann, Martins e Lima (2013) e Provansal et al. (2010) demonstraram diminuição da expressão de vimentina frente à superexpressão de PrP^C, e aumento de sua expressão com a infecção da célula com PrP^{Sc}. Com base nisso, fizemos um experimento que envolveu a quantificação da expressão de vimentina nas células HeLa e N2a frente a transfecção dos diferentes vetores para a expressão das distintas formas de PrP, sob os tratamentos com MG132 e CsA. A ideia era correlacionar a quantidade de vimentina nos diferentes contextos celulares com a formação de espécies semelhantes à PrP^{Sc}.

Para isso foi realizada a transfecção de células HeLa e N2a com vetores para expressão de GFP, GFP-PrP^C, GFP-PrP^{Cy}, e também PrP^C P104L e PrP^C V179I para simular uma infecção com PrP^{Sc}. Também como controle, foi feito o experimento com ambas as células não transfectadas (que serão identificadas nas imagens a seguir como “NT”). Além disso, usamos DMSO como controle de célula sem tratamento, e tratamentos com MG132 e com CsA.

Os *Western Blots* obtidos do experimento com os extratos de célula HeLa são mostrados na FIGURA 25.

FIGURA 25 – WESTERN BLOTS COM ANTICORPOS ANTI-VIMENTINA E ANTI-VINCULINA EM CÉLULAS HELA.

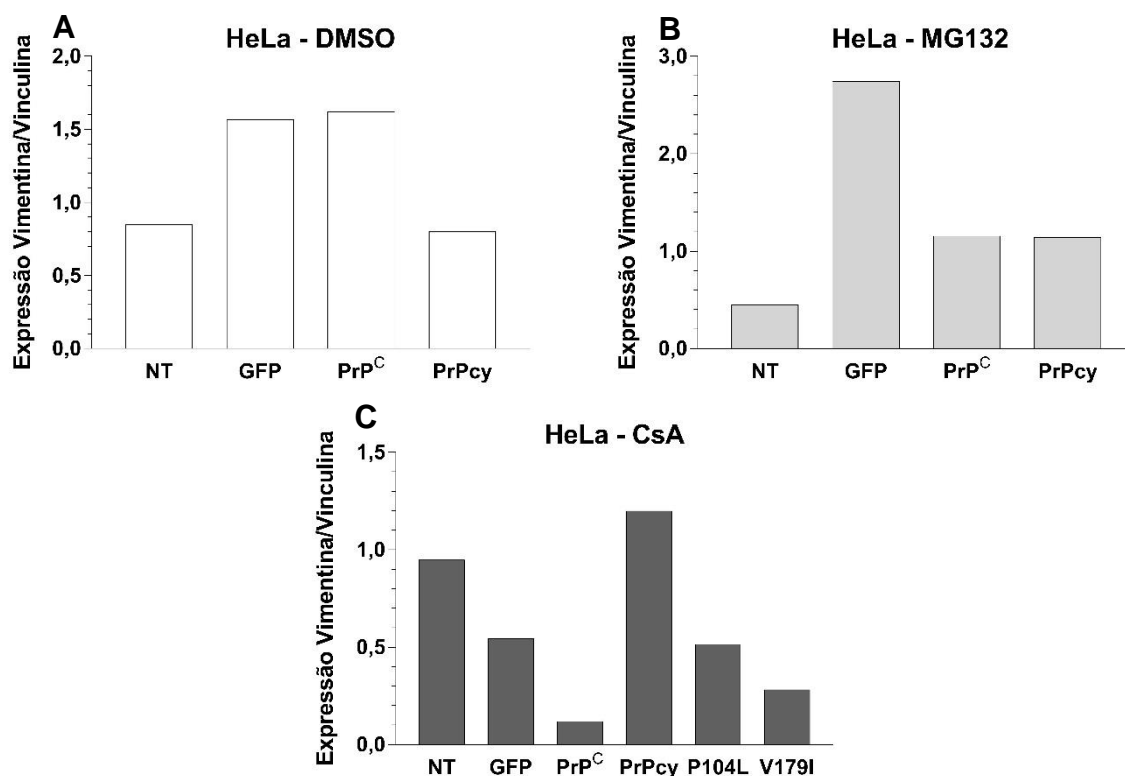


Western Blots com extratos de células HeLa em diferentes condições de transfecção e tratamento. A legenda de cada canaleta indica a proteína codificada pelo plasmídeo transfectado e o tratamento aplicado na célula. “NT” se refere às células não transfectadas. Na figura A estão indicados os tratamentos com DMSO e MG132, e na figura B está indicado o tratamento com CsA. FONTE: O autor (2017).

As bandas de vinculina demonstram que as quantidades de proteína colocada em cada canaleta do gel foram semelhantes, dando-nos certeza de que as diferenças na quantidade de vimentina são referentes aos tratamentos de fato, e não a uma maior adição de proteínas durante a corrida do gel de eletroforese. Para melhor visualização dos resultados, as bandas de vimentina e vinculina que surgiram nos *Western Blots* foram densitometradas, normalizadas e os valores obtidos foram plotados em gráficos. Os resultados foram separados em blocos de acordo com os tratamentos de DMSO,

MG132 e CsA, dessa forma, compararemos a diferença da vimentina de acordo com as proteínas superexpressas em cada bloco de experimento. Os gráficos resultantes são mostrados na FIGURA 26.

FIGURA 26 – DENSITOMETRIA DOS *WESTERN BLOTS* DE CÉLULA HELA.



Os gráficos mostram as quantidades de vimentina normalizadas pela quantidade de vinculina em células HeLa tratadas com DMSO (A), MG132 (B) ou CsA (C). FONTE: O autor (2017).

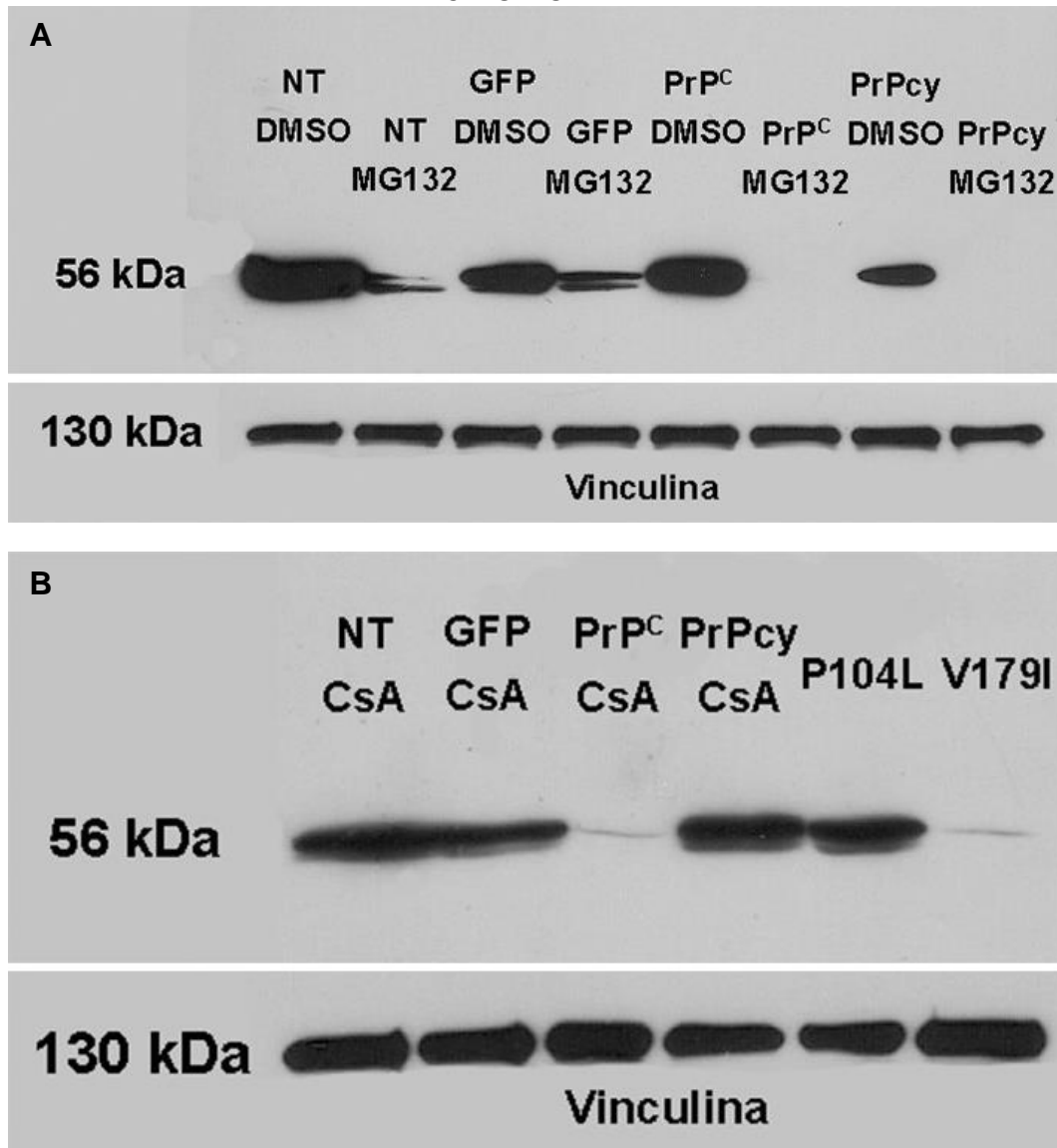
Observa-se na FIGURA 26A que, quando a célula é tratada com DMSO, tanto a expressão de GFP quanto a de PrP^C levam a um aumento de quase duas vezes a quantidade de vimentina observada na célula sem transfecção. Mas o mesmo não acontece quando a célula é transfectada com PrPcy, que apresenta praticamente a mesma quantidade de vimentina da célula não transfectada. Quando consideramos o tratamento com MG132 (FIGURA 26B), entretanto, todas as condições demonstram maior expressão de vimentina em relação ao controle sem transfecção, embora GFP se destaque como a condição com maior quantidade desta. Fazendo uma comparação entre os experimentos com tratamento de DMSO e MG132, vemos que o segundo é capaz de diminuir a quantidade de vimentina da célula sem transfecção mas não o faz com a célula transfectada com PrPcy, embora ambas as condições possuíssem quantidades iguais de vimentina nas células tratadas com DMSO. Para GFP, o tratamento com MG132 parece intensificar ainda mais a expressão de

vimentina pela célula, enquanto para PrP^C ele parece diminuir a expressão quando em comparação com o tratamento com DMSO.

No tratamento com CsA (FIGURA 26C), as células que expressam GFP ou PrP^C apresentaram quantidades reduzidas de vimentina. Já as células com PrP^{Cy} tiveram quantidade aumentada da vimentina quando comparadas ao controle sem transfecção. Ao transfectarmos as células com os plasmídeos que codificam para PrP^C P104L e V179I vemos comportamentos que se assemelham às condições de GFP e PrP^C, respectivamente, mas ambos com menor expressão de vimentina se comparados com PrP^{Cy} e com a célula não transfectada.

O mesmo experimento feito em HeLa foi repetido em células N2a, para avaliar se as transfecções e os tratamentos teriam efeitos iguais ou diferentes em uma célula neuronal e de mesma espécie das proteínas expressas nos vetores de transfecção. Todas as considerações de comparação entre DMSO/MG132 e CsA feitas para a célula HeLa são igualmente válidas neste experimento. Os *Western Blots* obtidos são apresentados na FIGURA 27.

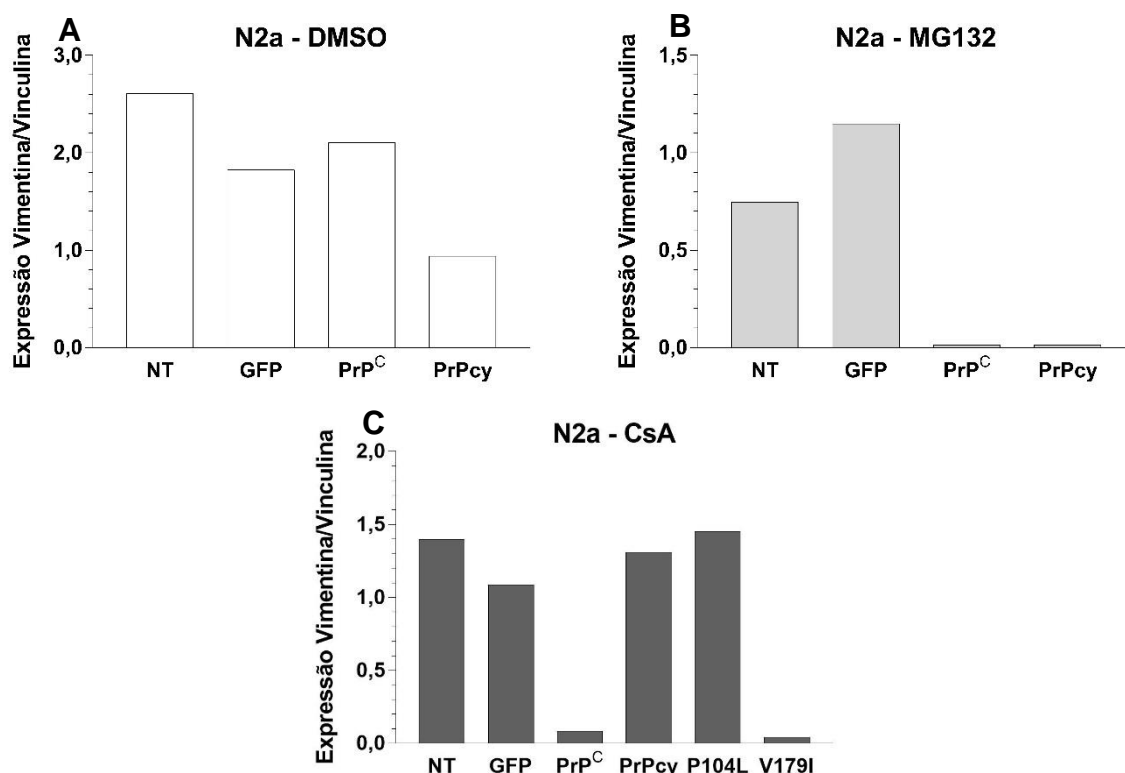
FIGURA 27 – WESTERN BLOTS COM ANTICORPOS ANTI-VIMENTINA E ANTI-VINCULINA EM CÉLULAS N2A.



Western Blots com extratos de células N2a em diferentes condições de transfecção e tratamento. A legenda de cada canaleta indica a proteína codificada pelo plasmídeo transfectado e o tratamento aplicado na célula. “NT” se refere às células não transfectadas. Na figura A estão indicados os tratamentos com DMSO e MG132, e na figura B está indicado o tratamento com CsA. FONTE: O autor (2017).

Novamente, o *Western Blot* com vinculina revela que a diferença da expressão de vimentina não é devido a uma adição de maior quantidade de proteínas nas diferentes canaletas de corrida do gel, mas sim, devido ao próprio tratamento feito. Para facilitar a interpretação dos dados, as bandas foram densitometradas e normalizadas, como anteriormente descrito. Os gráficos resultantes são mostrados na FIGURA 28.

FIGURA 28 – DENSITOMETRIA DOS WESTERN BLOTS DE CÉLULAS N2A.



Os gráficos mostram as quantidades de vimentina normalizadas com a vinculina em células N2a tratadas com DMSO (A), MG132 (B) ou CsA (C). FONTE: O autor (2017).

O tratamento das células com DMSO apresentou resultados diferentes dos obtidos para as células HeLa. A quantidade de vimentina nas células expressando GFP e PrP^C foi inferior à quantidade dela nas células não transfectadas, e PrP_{cy}, que em HeLa havia mantido a mesma quantidade de vimentina das células NT, teve a expressão da proteína equivalente à metade da quantidade apresentada nas células não transfectadas.

No tratamento com MG132, houve diminuição da quantidade de vimentina expressa pelas células não transfectadas, caindo em pouco mais da metade quando em comparação com o tratamento com DMSO, semelhante ao que ocorreu com as células HeLa. Nas células expressando GFP, embora a quantidade da vimentina permaneça mais alta do que nas células NT, houve redução de sua quantidade em comparação com o tratamento com DMSO. Surpreendentemente, não foi possível a detecção de vimentina nas canaletas com extrato de células transfectados com PrP^C ou PrP_{cy}, mesmo com altos tempos de exposição.

O tratamento com CsA gerou, para as células NT ou expressando GFP, resultados bem semelhantes às condições de tratamento com DMSO, com alta quantidade de vimentina na primeira e um pouco menos de sua quantidade na

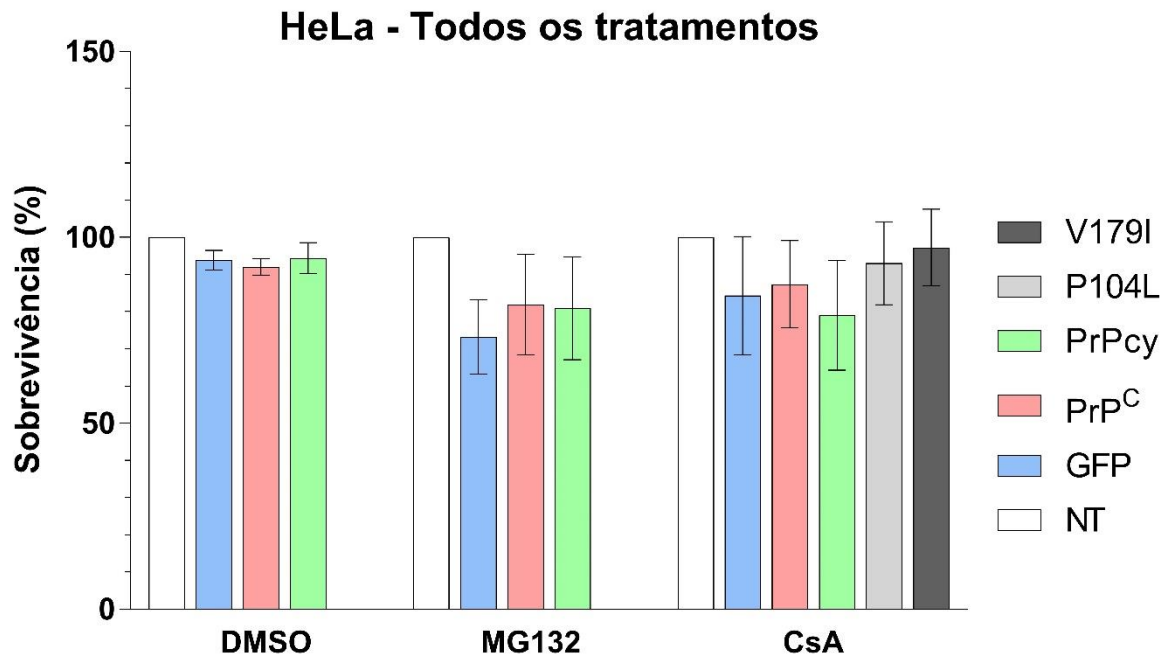
segunda condição. Entretanto, os resultados variaram grandemente para as demais condições. Nas células com PrP^C o resultado encontrado foi semelhante ao tratamento com MG132, com baixíssimas quantidades de vimentina expressa. Por outro lado, para as células expressando PrP^{Cy}, o resultado foi completamente diferente, com aumento da quantidade de vimentina, assemelhando-se ao controle de células NT. Para as células transfectadas com PrP^C P104L e V179I os resultados foram discrepantes. Embora ambos os plasmídeos codifiquem para formas mutadas de PrP^C, cada proteína apresentou um comportamento diferente, sendo que com o P104L houve grande quantidade de vimentina expressa, tal como nas células não transfectadas, enquanto com o V179I houve resultado semelhante a PrP^C, com baixíssimas quantidades de vimentina nas células. Certa diferença na quantidade de vimentina entre os mutantes P104L e V179I também havia sido observada nas células HeLa, mas essa diferença foi intensificada em N2a.

5.4 ENSAIO DE MORTE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT

O ensaio de MTT tem como função verificar se as transfecções com os diferentes vetores e os tratamentos, em conjunto com suas implicações diretas e indiretas, têm efeito na taxa de morte das células.

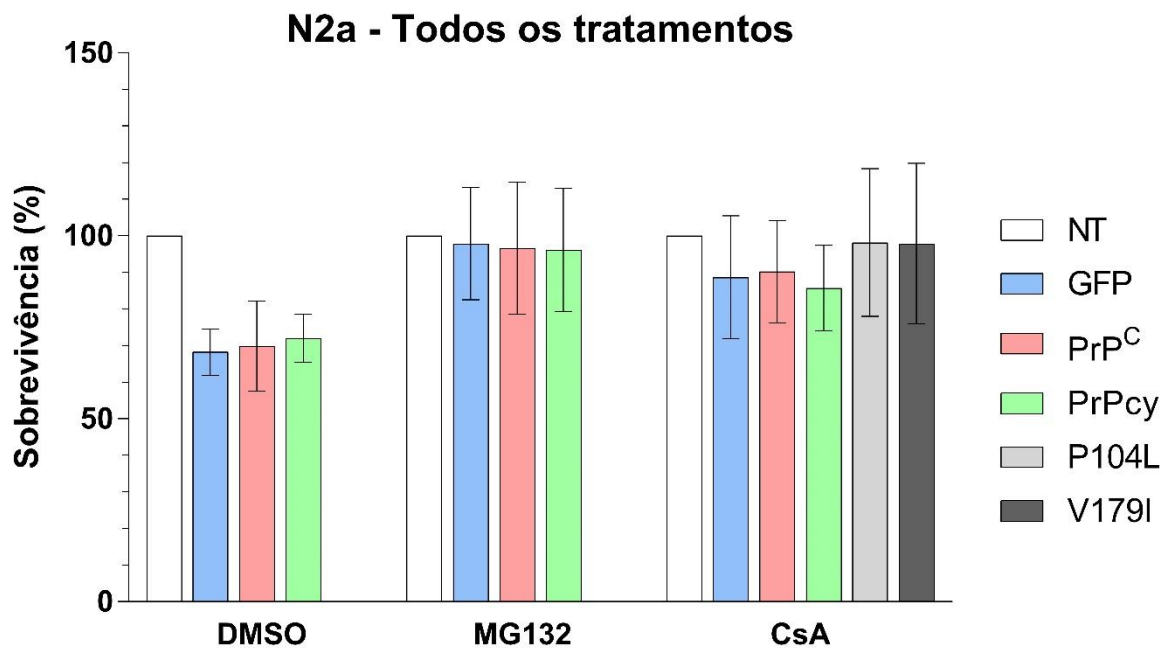
Os experimentos foram realizados com células HeLa e N2a transfectadas com plasmídeos que codificam para GFP, PrP^C, PrP^{Cy}, PrP^C P104L e V179I, ou deixadas sem transfecção, e tratadas com DMSO, MG132 ou CsA. Os resultados obtidos representam três experimentos individuais e são mostrados na FIGURA 29 para as células HeLa e na FIGURA 30 para as células N2a. Os gráficos foram feitos de maneira que as transfecções são comparadas unicamente dentro de seu próprio grupo de tratamento. Ou seja, as transfecções de GFP, PrP^C e PrP^{Cy} tratadas com MG132, por exemplo, são comparadas apenas ao controle de células NT tratadas igualmente com MG132, não sendo feitas comparações com controles de outros tratamentos.

FIGURA 29 – VIABILIDADE CELULAR EM HELA.



FONTE: O autor (2017).

FIGURA 30 – VIABILIDADE CELULAR EM N2A.



FONTE: O autor (2017).

Ao fazermos o teste estatístico ANOVA testando todas as comparações possíveis entre as condições para ambas as células, nenhum resultado foi estatisticamente significativo. Embora as barras do tratamento com MG132 em HeLa (FIGURA 29) e as barras do tratamento com DMSO em N2a (FIGURA 30) estejam

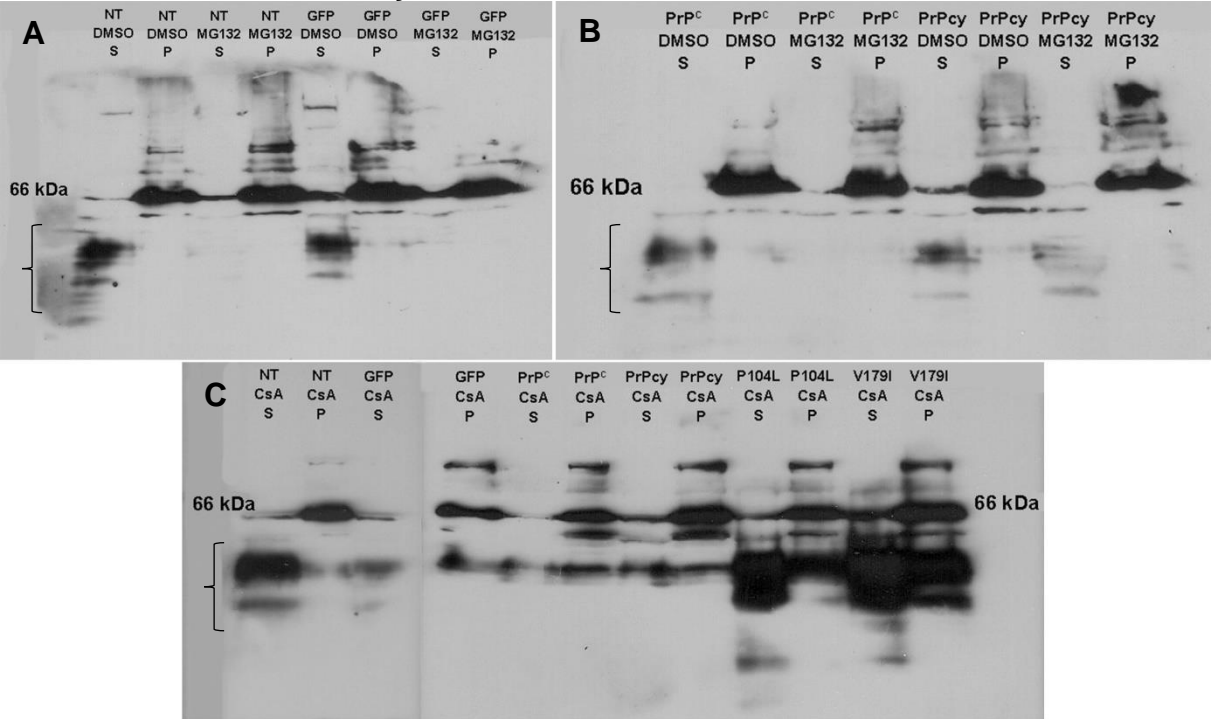
visualmente mais baixas que a barra de seus respectivos controles, o desvio padrão de cada amostra torna-as não significativas. Para as demais condições, as barras apresentam valores visualmente próximos de seus controles não transfectados.

5.5 SOLUBILIDADE DE PRP^C COM METANOL

O ensaio de solubilidade com metanol tem como propósito avaliar se os tratamentos e os diferentes plasmídeos transfectados fazem com que PrP fique mais insolúvel, adquirindo assim propriedades *scrapie-like* (LINDEN et. al, 2008).

Como descrito nos materiais e métodos, foi adicionado metanol 100% aos sobrenadantes (que serão identificados nas figuras abaixo como S) e aos *pellets* (que serão identificados nas figuras abaixo como P) dos extratos das células HeLa e N2a, fazendo a precipitação a -80°C *overnight*. Após isso, fez-se *Western Blot* com as amostras usando anticorpo anti-PrP. Os resultados dos experimentos são mostrados nas FIGURAS 31 e 32, para HeLa e N2a, respectivamente.

FIGURA 31 – PRECIPITAÇÃO DE PRP COM METANOL EM CÉLULAS HELA.

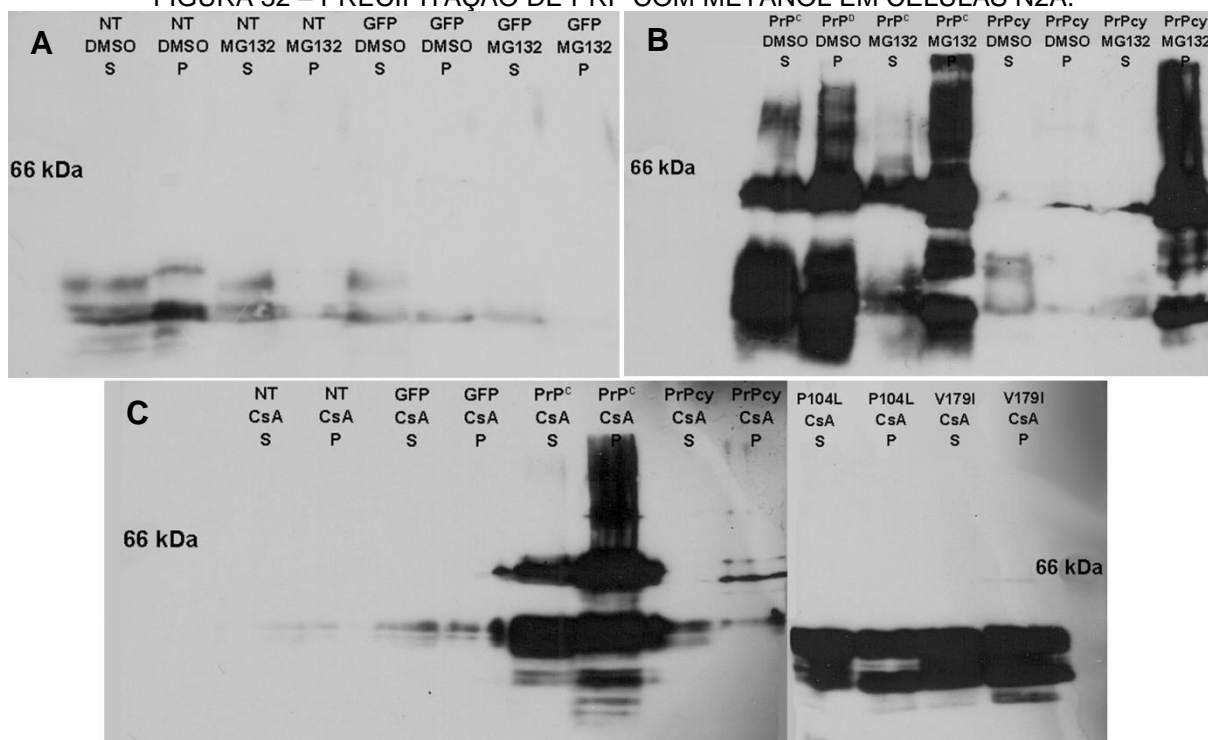


Sobrenadantes (S) e *pellets* (P) de células HeLa precipitados com metanol. A figura A mostra as células sem transfecção ou transfectadas com GFP e tratadas com DMSO ou MG132, a figura B mostra as células transfectadas com PrP^C ou PrP^Cy e tratadas com DMSO ou MG132, e a figura C mostra as células tratadas com CsA. FONTE: O autor (2017).

Aparentemente, a solubilidade de PrP não foi grandemente alterada em nenhum dos tratamentos e transfecções feitos em HeLa, o que observamos são apenas pequenas variações nas quantidades de proteína nos sobrenadantes e nos *pellets*. Começando pela FIGURA 31A, nota-se que o tratamento com MG132 tanto nas células NT quanto nas transfectadas com plasmídeo expressando GFP faz com que as bandas de PrP formadas em torno de 35 kDa (que representam as formas mono, di e não glicosiladas do PrP^C endógeno, apontadas nas figuras com uma chave) no sobrenadante desapareça, enquanto a mesma aparece nos tratamentos com DMSO. Apesar disso, não há aumento relevante na quantidade de PrP nos *pellets* dos tratamentos com MG132. Na FIGURA 31B, a situação se repete, pois o tratamento com MG132 parece diminuir a quantidade de PrP^C endógeno nos sobrenadantes das células superexpressando PrP^C e PrP^{Cy}, sem que haja maior acúmulo no *pellet*.

O tratamento com CsA (FIGURA 31C), inesperadamente, não surtiu nenhum efeito sobre a solubilidade de PrP. Inclusive, a quantidade de PrP nos sobrenadantes e nos *pellets* parece constante em todas as condições de transfecção das células. O que vemos, todavia, é que as transfecções com PrP^C P104L e V179I parecem aumentar de um modo geral a quantidade de PrP^C que é expresso nas células, quando comparado com as demais superexpressões de PrP^C e PrP^{Cy}, por exemplo. Isso porque os vetores codificam esses mutantes sem nenhuma etiqueta de proteína de fusão, produzindo espécies de PrP de mesma massa molecular que o PrP^C endógeno. Mas apesar desse aumento na expressão, a porcentagem que permanece no sobrenadante e no *pellet* parece semelhante às demais condições.

FIGURA 32 – PRECIPITAÇÃO DE PRP COM METANOL EM CÉLULAS N2A.



Sobrenadantes (S) e *pellets* (P) de células N2a precipitados com metanol. A figura A mostra as células sem transfecção ou transfectadas com GFP e tratadas com DMSO ou MG132, a figura B mostra as células transfectadas com PrP^C ou PrP^CY e tratadas com DMSO ou MG132, e a figura C mostra as células tratadas com CsA. FONTE: O autor (2017).

Já para as células N2a (FIGURA 32) obtivemos resultados diferentes dos experimentos com células HeLa. Nas células N2a não transfectadas (FIGURA 32A) e tratadas com DMSO, há uma maior quantidade de PrP^C no *pellet* do que no sobrenadante. Essa proporção será tomada como padrão fisiológico da solubilidade de PrP nesse modelo celular. Esse padrão não se mantém quando a célula é tratada com MG132, em que, surpreendentemente, há redução da quantidade de PrP no *pellet* celular.

Para as células expressando GFP, nenhum dos tratamentos (FIGURAS 32A e C) parece influenciar a distribuição de PrP nas frações do sobrenadante e do *pellet*, mostrando que a proteína de fusão não é capaz de alterar a solubilidade de PrP.

Nas células transfectadas com plasmídeos para PrP^C e PrP^CY percebe-se grandes diferenças nos tratamentos (FIGURAS 32B E C). A superexpressão de PrP^C combinada com o tratamento com DMSO gera o mesmo padrão do que seria a distribuição normal de PrP^C, sendo este um pouco mais presente no *pellet* do que no sobrenadante, resultado muito semelhante ao tratamento com DMSO nas células NT, que se aplica para o PrP^C endógeno e também para o recombinante. Ao adicionarmos

MG132 às células superexpressando PrP^C, vemos que o padrão de distribuição se altera. A quantidade de PrP^C endógeno (banda de aproximadamente 35 kDa) no sobrenadante diminui, enquanto há acúmulo de formas mais pesadas (acima de 60 kDa) de PrP^C no *pellet* da precipitação. Resultado semelhante foi obtido no tratamento das células expressando PrP^C com CsA (FIGURA 32C).

Para PrP^{Sc} (FIGURAS 32B e C), os resultados obtidos nos tratamentos com DMSO e CsA se assemelham muito àqueles das células NT tratadas com DMSO. O único resultado que destoa dos demais é na condição em que as células N2a são tratadas com MG132. Enquanto no sobrenadante há uma quantidade muito pequena de PrP, no *pellet* há intenso acúmulo de proteína, muito semelhante aos resultados de MG132 e CsA nas células superexpressando PrP^C.

Quanto às transfecções com PrP^C P104L e V179I, os resultados obtidos parecem estar de acordo com o padrão de distribuição observado para as células NT tratadas com DMSO, com quantidade ligeiramente superior de PrP^C no *pellet*.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho buscou-se demonstrar as possíveis correlações existentes entre a formação de agressomos, a modulação da expressão de vimentina, a solubilidade de PrP e a viabilidade celular em células HeLa e N2a.

Para facilitar a visualização dos resultados num panorama mais amplo, decidimos resumi-los na TABELA 3. Os resultados de MTT não foram incluídos na tabela pelo fato de nenhuma das condições ter sido estatisticamente significativa.

TABELA 3 – RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA, EXPRESSÃO DE VIMENTINA E SOLUBILIDADE EM METANOL.

Superexpressão e tratamentos	HeLa			N2a		
	Agressomos	Expressão Vimentina*	Solubilidade de PrP**	Agressomos	Expressão Vimentina*	Solubilidade de PrP**
NT DMSO	Não	Baixa	Solúvel	Não	Muito alta	Solúvel
NT MG132	Não	Muito baixa	Solúvel	Sim	Baixa	Solúvel
NT CsA	Não	Baixa	Solúvel	Sim	Média	Solúvel
GFP DMSO	Não	Alta	Solúvel	Não	Alta	Solúvel
GFP MG132	Sim	Muito alta	Solúvel	Sim	Média	Solúvel
GFP CsA	Não	Baixa	Solúvel	Não	Média	Solúvel
PrP ^C DMSO	Não	Alta	Solúvel	Não	Muito alta	Solúvel
PrP ^C MG132	Sim	Média	Solúvel	Sim	Muito baixa	Insolúvel
PrP ^C CsA	Talvez	Muito baixa	Solúvel	Sim	Muito baixa	Insolúvel
PrP ^{Cy} DMSO	Não	Baixa	Solúvel	Não	Baixa	Solúvel
PrP ^{Cy} MG132	Não	Média	Solúvel	Sim	Muito baixa	Insolúvel
PrP ^{Cy} CsA	Não	Média	Solúvel	Não	Média	Solúvel
P104L	Não	Baixa	Solúvel	Não	Média	Solúvel
V179I	Não	Muito baixa	Solúvel	Sim	Muito baixa	Solúvel

*Muito baixa: $x \leq 0,5$; Baixa: $0,5 < x \leq 1,0$; Média: $1,0 < x \leq 1,5$; Alta: $1,5 < x \leq 2,0$; Muito alta: $x > 2,0$.

**Solúvel: quantidades de PrP no sobrenadante e no *pellet* semelhantes ao controle NT DMSO, ou com maior quantidade no sobrenadante; Insolúvel: quantidade de PrP no *pellet* maior do que a do controle NT DMSO. FONTE: O autor (2017).

A técnica de *Pull-Down* em células HeLa foi capaz de demonstrar que a interação entre as proteínas vimentina e PrP^C é passível de ocorrer *in vitro*, confirmando os resultados de duplo-híbrido obtidos por Giménez et al. (2015). Anteriormente, o trabalho de Kristiansen et al. (2005) demonstrou a interação entre vimentina e PrP^{Sc} em células GT-1 (células neuronais de camundongo) pela técnica

de co-imunoprecipitação usando anticorpos anti-vimentina, mas a interação com PrP^C ainda não havia sido demonstrada.

De acordo com o trabalho de Johnston, Ward e Kopito (1998) a formação de agressomos é uma resposta celular geral induzida quando a capacidade de degradação do proteassoma é excedida pela taxa de acúmulo da proteína mal-dobrada, ou quando há inibição dos proteassomas da célula. Deste modo, independentemente de termos utilizado uma célula epitelial de câncer de colo de útero, as células HeLa também estão aptas a produzir esse tipo de resposta tanto quanto uma célula neuronal como a N2a. Portanto, ambas as linhagens celulares apresentam relevância na avaliação da formação de agressomos frente às diferentes condições de vimentina e PrP.

Com a técnica de imunofluorescência foi possível ver a formação de agressomos em ambas as células HeLa e N2a. Devido à captura das imagens em microscópio confocal pudemos observar os agressomos em diferentes planos de corte, sendo possível visualizar seu interior com proteína acumulada e também a estrutura semelhante a uma gaiola de vimentina envolvendo este agregado (ver APÊNDICE 2). Imagens com a estrutura de agressomo tal como observamos em nossos experimentos também são encontradas no trabalho de Johnston, Ward e Kopito (1998).

No experimento de imunofluorescência com células HeLa transfectadas com plasmídeo que expressa GFP em tratamento com MG132 (FIGURA 16B), embora não tenhamos usado anticorpos anti-GFP para verificar sua presença dentro da célula, pudemos ver a formação de agressomos. Tal resultado é plausível se considerarmos que GFP é uma proteína exógena expressa em grandes quantidades e que permanece no citosol celular. Além disso, o estudo publicado por Khmelinskii et al. (2016) indica que GFP pode ser degradada por via proteassomal, desse modo, o tratamento com MG132 implicaria em sua não degradação, e acúmulo na célula.

Por outro lado, a formação de agressomos não foi observada na transfecção com GFP quando as células HeLa foram tratadas com ciclosporina A (FIGURA 16C). Nesse caso, o tratamento com CsA não deveria causar nenhuma alteração celular de fato, uma vez que GFP não deve passar pela via de dobramento das ciclofilinas por não possuir pontes dissulfeto em sua estrutura (INOUE E TSUJI, 1994).

Acreditamos que as FIGURAS 17C e D, que mostram as células HeLa superexpressando PrP^C e tratadas com CsA, sejam o início e um tempo intermediário da resposta celular que culminará na formação de um agressomo. Embora o

tratamento usado seja relatado como controle positivo para a formação de agressomos (COHEN E TARABOULOS, 2003), uma das explicações possíveis para não o termos observado talvez seja o fato de que, embora a taxa de formação de PrP mal dobrado esteja aumentada nessas células, o proteassoma ainda está ativo, degradando boa parte desse PrP e fazendo com que a sua acumulação na célula seja mais lenta.

Não conseguimos observar a formação de agressomos em nenhum dos tratamentos feitos com as células HeLa superexpressando PrP^{Cy} (FIGURA 18), muito embora essa forma da proteína prion se localize no citosol celular após sua síntese. De fato, o trabalho de Dubnikov et al. (2016) indica que a entrada no retículo endoplasmático é um pré-requisito fundamental para a deposição de PrP nos agressomos, e que formas citosólicas que não são direcionadas para o RE além de não o formarem, não são carregadas para agressomos pré-existent nas células. Como nossa proteína de PrP^{Cy} não apresenta peptídeo sinal de endereçamento para o RE, ela não deveria ser capaz de formar agressomos. Uma possível existência de agressomos nos experimentos com MG132 e CsA poderia ser devido ao PrP^C endógeno das células, que é capaz de causar interferência nos resultados.

A superexpressão dos mutantes de PrP^C P104L e V179I em células HeLa levou à inesperada formação de estruturas semelhantes a filopódios nas células (FIGURA 19). É conhecido que PrP^C, ao interagir com alguns de seus parceiros moleculares, é capaz de promover a neuritogênese em células neuronais (LOPES et al., 2005). Todavia, essa resposta não era esperada em células de adenocarcinoma. O motivo da formação dessas estruturas não foi investigado mais a fundo.

Nas imunofluorescências com células N2a foi possível ver a formação de agressomos nas células não transfectadas e tratadas com MG132 (FIGURA 20B). A formação dessas estruturas mesmo nas células não transfectadas pode ser devido a uma alta quantidade endógena de PrP^C nas células N2a, pelo fato de esta ter origem neuronal. Uma maior quantidade endógena de PrP^C remete a uma maior síntese de proteínas, quando o proteassoma é bloqueado, a alta expressão da proteína faz com que sua taxa de acúmulo seja maior, formando agressomos mais rapidamente. Como não foram encontradas referências fazendo um comparativo entre a quantidade de PrP^C em diversas linhagens celulares, estamos tomando como base para este argumento a quantidade de agressomos de PrP^C formados nos tratamentos tanto com

HeLa quanto com N2a, sendo que na primeira só foi observada a formação de agressomos quando em superexpressão de PrP^C e tratamentos com MG132 e CsA.

Como anteriormente relatado, o trabalho de Dubnikov et al. (2016) afirma que as formas de PrP que não passam pelo retículo endoplasmático das células não são carregadas para ao agressomos em formação. Na FIGURA 23B, todavia, é possível ver a formação de agressomos nas células N2a tratadas com MG132 expressando PrP^{Cy}. Uma explicação para isso talvez seja a interferência da forma endógena de PrP no resultado do experimento. Todos os tratamentos em N2a feitos com MG132 levaram à formação de agressomos, mesmo nas células não transfectadas. Como não realizamos o silenciamento de PrP^C endógeno, é possível que esses agressomos formados na FIGURA 23B não sejam compostos de PrP^{Cy}, mas sim da forma endógena de PrP presente na célula. Para diferenciar quais as formas de PrP presentes em casa condição, uma possibilidade seria o uso de anticorpos anti-GFP, para detectar apenas as formas transfectadas da proteína. Em alguns experimentos de imunofluorescência, nós tentamos usar anticorpos anti-GFP com essa finalidade, mas os resultados obtidos não foram satisfatórios em afirmar que a marcação promovida por este anticorpo era específica para as proteínas de fusão utilizadas.

Ainda sobre as imunofluorescências em células N2a, percebemos diferentes respostas para os mutantes de doenças P104L e V179I quanto a formação de agressomos (FIGURA 24). Enquanto há clara formação dessas estruturas nas células contendo o PrP^C mutado V179I, não foi possível observar sua formação nas células expressando P104L. O trabalho de Bosque e Prusiner (2000) demonstra que células N2a são mais susceptíveis à infecção com algumas espécies de PrP^{Sc} do que com outras. Uma explicação citada no trabalho é que algumas espécies de PrP^{Sc} podem levar a uma maior taxa de divisão celular, fazendo com que sua quantidade acumulada dentro da célula seja menor ao longo do tempo. Tal fenômeno também parece ser observado *in vivo*, tendo em vista que certas regiões do cérebro acumulam maior quantidade de *scrapie* do que as demais. Talvez esses dados possam ser extrapolados para a nossa situação. Neste caso, a formação de agressomos apenas no mutante V179I poderia ser decorrente de elevada mitose das células expressando P104L, fazendo com que sua taxa de acúmulo seja menor, e que portanto a formação de agressomos seja mais lenta. Deve-se mencionar que o anticorpo usado anti-PrP, não nos permite diferenciar se o agressomo é formado exclusivamente por PrP endógeno, pelo mutante V179I ou por ambos.

Durante a normalização da quantidade de proteína presente nos *Western Blots*, utilizamos a proteína vinculina como controle de expressão constitutiva. Pelo fato de a vinculina ser uma proteína de citoesqueleto, tal como a vimentina, não podemos excluir a possibilidade de haver a modulação de sua expressão de acordo com a quantidade de vimentina total presente na célula. Entretanto, trabalhos como o de Colucci-Guyon et al. (1994) afirmam que mesmo o nocaute completo de vimentina de um organismo não gera compensação na expressão de outra proteína de citoesqueleto. Por tal motivo, resolvemos prosseguir com a vinculina como gene constitutivo.

Os trabalhos de Hartmann, Martins e Lima (2013) e Provansal et al. (2010) demonstraram diminuição da quantidade de vimentina na superexpressão com PrP^C e aumento em sua quantidade na infecção com PrP^{Sc}. Os resultados que obtivemos para as células HeLa e N2a (FIGURAS 26 e 28, respectivamente) diferem um pouco dos apresentados nos trabalhos acima, e diferem também para as duas linhagens celulares. Nas células HeLa tratadas com DMSO (FIGURA 26A), a superexpressão de PrP^C gera um aumento na quantidade de vimentina expressa em aproximadamente duas vezes em comparação com as células não transfectadas. Já para as células N2a em mesmo tratamento (FIGURA 28A), mesma linhagem utilizada no trabalho de Provansal et al. (2010), observou-se diminuição da quantidade de vimentina expressa em contexto de superexpressão de PrP^C.

Aparentemente, a formação de agressomos tende a diminuir a quantidade de vimentina que é expressa nas células. Para as células HeLa, os tratamentos com MG132 e CsA em células superexpressando PrP^C demonstraram a formação de agressomos. Ao se observar a quantidade de vimentina dessas condições (FIGURAS 26B e C), é possível perceber que sua quantidade está relativamente mais baixa do que em comparação com as demais que não formam agressomos e também com os controles de DMSO (FIGURA 26A). Ao mesmo tempo, esses tratamentos parecem não afetar a quantidade de vimentina expressa em células transfectadas com PrP^{Cy}, fornecendo mais um indício de que essa proteína não leva à formação de agressomos. Um outro detalhe a ser observado é a diminuição da quantidade de vimentina das células HeLa NT tratadas em MG132 quando em comparação com o controle tratado com DMSO. Embora não tenha sido feita imunofluorescência em células HeLa sem transfecção tratadas com inibidor de proteassoma, é possível que haja a formação de

agressomos nestas condições, assim como em N2a, explicando então a diminuição da vimentina expressa.

Ainda sobre as células HeLa, a formação de agressomos em células supexpressando apenas GFP parece ser uma exceção a essa regra. O tratamento dessas células com MG132, que levou à formação de agressomos no experimento de imunofluorescência, resultou no aumento da expressão de vimentina nesta condição em comparação com o tratamento com DMSO. É possível que a expressão de GFP leve a outras consequências celulares que resultem no aumento da quantidade de vimentina endógena, mas outros experimentos serão necessários para confirmar isso.

A premissa de que a formação de agressomos reduz a vimentina expressa também é aplicável para as células N2a (FIGURA 28). Todas as condições que demonstraram formação de agressomos nas células N2a (NT, GFP, PrP^C, PrP^{Cy} tratadas com MG132 e PrP^C tratada com CsA) tiveram sua quantidade de vimentina endógena reduzida quando em comparação com os seus respectivos controles de DMSO (FIGURA 28A). Em alguns casos, a redução foi tão extrema que praticamente não foi possível a detecção de vimentina nessas amostras (PrP^C e PrP^{Cy} tratadas com MG132).

Para ambas as células HeLa e N2a, é possível observar que as transfecções com os mutantes de PrP^C P104L e V179I apresentam resultados diferentes quanto à expressão de vimentina, sendo que em HeLa essa diferença é um pouco mais sutil (FIGURAS 26C e 28C). Em ambos os casos, P104L parece ter menor efeito na diminuição da vimentina celular do que V179I. Em células N2a isso é bem perceptível, uma vez que a quantidade de vimentina em V179I é extremamente baixa e se assemelha a de PrP^C tratado com CsA, enquanto P104L apresenta valores semelhantes ao controle NT com CsA. Esses resultados podem ser um segundo indício de que, tal como citado por Bosque e Prusiner (2000), algumas cepas de prion podem demonstrar diferentes efeitos em cultura de células.

Quando investigou-se a formação de agressomos era responsável por uma diminuição na viabilidade das células, não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos para suportar essa hipótese (FIGURAS 29 e 30). Ao verificar a literatura, é possível perceber que os resultados encontrados diferem grandemente, com relatos de Kristiansen et al. (2005), Restelli et al. (2010) e Roucou et al. (2003) indicando que PrP^{Cy} não apresenta função tóxica, enquanto trabalhos de Rambold et al. (2006) e de nosso próprio grupo, utilizando a mesma linhagem celular

N2a, afirmam que há diferença na citotoxicidade de PrP^{Cy}, por exemplo. O que foi possível perceber, todavia, é que os tratamentos com MG132 e CsA demonstram redução na taxa de viabilidade comparando com as células tratadas com DMSO (resultado não mostrado). Como os experimentos de MTT apresentaram desvios padrão altos, seria necessário repetir os experimentos de modo a reduzi-los, para que pudéssemos ter melhor visualização do que acontece em cada condição, podendo assim tirar conclusões mais satisfatórias.

A solubilidade de PrP em metanol apresentou resultados diferentes para as células HeLa e N2a (FIGURAS 31 e 32). Em HeLa vemos uma sutil diminuição de PrP endógeno no sobrenadante das células não tranfectadas e superexpressando GFP e PrP^C quando em tratamento com MG132, mas o mesmo não ocorre nas células tratadas com DMSO ou superexpressando PrP^{Cy}, por exemplo (FIGURAS 31A e B). Já em N2a, o aumento da insolubilidade de PrP pode ser facilmente notado nas células superexpressando PrP^C tratadas com MG132 e CsA, e na superexpressão de PrP^{Cy} em tratamento com MG132, condições essas que apresentaram formação de agressomos nas imunofluorescências (FIGURAS 32B e C). Todavia, condições de N2a não transfectadas tratadas com MG132 ou CsA ou superexpressando GFP em tratamento com MG132 (FIGURAS 32A e B), que formaram agressomos nas imunofluorescências, não apresentaram o mesmo padrão de insolubilidade visualizado nas outras condições.

Além disso, nos *Western Blots* de HeLa (FIGURA 31), mesmo nas células expressando apenas a forma endógena de PrP^C (na altura de aproximadamente 35 kDa), há a formação de bandas na altura aproximada de 60-70 kDa. Embora não possamos afirmar com certeza, acreditamos que a precipitação com metanol em células HeLa seja capaz de formar dímeros de PrP^C que não são desfeitos com a adição de tampão de amostra redutor, uma vez que o anticorpo foi testado nos extratos das mesmas células previamente à precipitação com metanol e não foram notadas bandas inespecíficas nessa altura (resultado não mostrado).

Esses experimentos de solubilidade indicam que tanto PrP^C, quanto PrP^{Cy} induzem a formação de formas de PrP *scrapie-like* em condições de inibição de proteassoma (tratamento com MG132) ou de indução de proteínas mal dobradas (tratamento com CsA), somente em células N2a e não em células HeLa. De fato, vários trabalhos indicam que essas formas ocorrem em determinados tipos celulares, principalmente neuronais, e não em outros (MA, WOLLMANN e LINDQUIST, 2002;

YEDIDIA et al., 2001; RESTELLI et al., 2010). Embora existam algumas exceções, a maioria das formas mais insolúveis de PrP foram associadas à formação de agressomos e a uma menor quantidade de vimentina endógena.

7 CONCLUSÕES

- O trabalho foi satisfatório em confirmar a interação entre as proteínas prion celular e vimentina verificada no experimento de duplo híbrido, realizado anteriormente pelo grupo;
- Com as imunofluorescências foi possível observar a formação de agressomos tanto em células HeLa quanto em N2a, em tratamentos com o inibidor de proteassoma MG132 e com CsA, um inibidor da via de dobramento de PrP^C;
- Foi notado que a formação dos agressomos parece modular a expressão de vimentina endógena, demonstrando tendência a reduzi-la na maior parte das condições testadas;
- PrP parece adquirir insolubilidade semelhante a PrP^{Sc} em células N2a em condições de formação de agressomos, mas não em células HeLa;
- A viabilidade das células não foi alterada por nenhum tratamento com condição de transfecção testada em ambas as células HeLa e N2a.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO-MORANTES, C.Y.; WILLE, H. **The structure of human prions: From biology to structural models – Considerations and pitfalls.** *Viruses*, vol. 6 no. 10, pp. 3875-3892, 2014.
- ADAM, P.; KRIZKOVÁ, S.; HEGER, Z.; BABULA, P.; PEKARIK, V.; VACULOVICOÁ, M.; GOMES, C.M.; KIZEK, R.; ADAM, V. **Metallothioneins in prion- and amyloid-related diseases.** *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 51, no. 3, pp. 637-656, 2016.
- BENDHEIM, P.E.; BROWN, H.R.; RUDELLI, R.D.; SCALA, L.J.; GOLLER, N.L.; WEN, G.Y.; KASCSAK, R.J.; CASHMAN, N.R.; BOLTON, D.C. **Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein.** *Neurology*, vol. 42, no.1, pp 149-156, 1992.
- BEN-ZE'EV, A. **Differential control of cytokeratins and vimentin synthesis by cell-cell contact and cell spreading in cultured epithelial cells.** *Journal of Cell Biology*, vol. 99, pp. 1424-1433, 1984.
- BOLTON, D.C.; MCKINLEY, M.P.; PRUSINER S.B. **Identification of a protein that purifies with the scrapie prion.** *Science*, vol 218, pp 1309-1311, 1982.
- BOSQUE, P.J.; PRUSINER, S.B. **Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection.** *Journal of Virology*, vol. 74, no. 9, pp. 4377-4386, 2000.
- BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1-2, pp. 248-254, 1976.
- BUCHNER, J. **Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones.** *FASEB Journal*, vol. 10, pp. 10-19, 1996.
- BÜELER, H.; FISCHER, M.; LANG, Y.; BLUETHMANN, H.; LIPP, H.P.; DEARMOND, S.J.; PRUSINER, S.B.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. **Normal development and behavior of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein.** *Nature*, vol. 356, pp 577-582, 1992.
- BÜELER, H.; AGUZZI, A.; SAILER, A.; GREINER, R.A.; AUTENRIED, P.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. **Mice devoid of PrP are resistant to scrapie.** *Cell*, vol 73, no 7, Pages 1339–1347, 1993.
- BYUN, Y.; CHEN, F.; CHANG, R.; TRIVEDI, M.; GREEN, K.J.; CRYNS, V.L. **Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis.** *Cell Death and Differentiation*, vol.8, pp. 443-450, 2001.
- CHAKRABARTI, O.; ASHOK, A.; HEDGE, R.S. **Prion protein biosynthesis and its emerging role in neurodegeneration.** *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 34, no. 6, pp. 287-295, 2009.

CHESEBRO, B.; TRIFILO, M.; RACE, R.; MEADE-WHITE, K.; TENG, C.; LACASSE, R.; RAYMOND, L.; FAVARA, C.; BARON, G.; PRIOLA, S.; CAUGHEY, B.; MASLIAH, E.; OLDSTONE, M. **Anchorless prion proteins results in infectious amyloid disease without clinical scrapie.** *Science*, vol. 308, no. 5727, pp. 1435-1439, 2005.

COHEN, E.; TARABOULOS, A.; **Scrapie-like prion protein accumulates in aggresomes of cyclosporine A-treated cells.** *The European Molecular Biology Organization Journal*, vol. 22, no. 3, pp. 404-417, 2003.

COLUCCI-GUYON, E.; PORTIER, M.M.; DUNIA, I.; PAULIN, D.; POURNIN, S.; BABINET, C. **Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype.** *Cell*, vol. 79, pp. 679-694, 1994.

CORCHERO, J.L. **Eukaryotic aggresomes: from a model of conformation diseases to an emerging type of immobilized biocatalyzers.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 100, pp. 559-569, 2016.

DUBNIKOV, T.; BEN-GEDALYA, T.; REINER, R.; HOEPFNER, D.; CABRAL, W.A.; MARINI, J.C.; COHEN, E. **PrP-containing aggresomes are cytosolic components of an endoplasmic reticulum quality control mechanism.** *Journal of Cell Science*, vol. 129, pp. 3635-3647, 2016.

FRANKE, W.W.; SCHMID, E.; WINTER, S.; OSBORN, M.; WEBER, K. **Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentin type in cultured cells from diverse vertebrates.** *Experimental Cell Research*, vol. 123, no. 1, pp. 25-46, 1979.

GIMÉNEZ, A.P.L.; RICHTER, L.M.L.; ATHERINO, M.C.; BEIRAO, B.C.B.; FAVARO, C.JR.; COSTA, M.D.M.; ZANATA, S.M.; MALNIC, B. MERCADANTE, A.F. **Identification of novel putative-binding proteins for cellular prion protein and a specific interaction with the STIP1 homology and U-box containing protein 1.** *Prion*, pp. 1-12, 2015.

GUO, N.; PENG, Z. **MG132, a proteasome inhibitor, induces apoptosis in tumor cells.** *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, vol. 9, no. 1, pp. 6-11, 2012.

HARTMANN, C.A.; MARTINS, V.R.; LIMA, F.R.S. **High levels of cellular prion protein improve astrocyte development.** *FEBS letters*, vol. 587, pp. 238-244, 2013.

HEAD, M.W.; RITCHIE, D.; SMITH, N.; MCLOUGHLIN, V.; NAILON, W.; SAMAD, S.; MASSON, S.; BISHOP, M.; MCCARDLE, L.; IRONSIDE, J.W. **Peripheral tissue involvement in sporadic, iatrogenic, and variant Creutzfeldt-Jakob disease.** *The American Journal of Pathology*, vol.164, no.1, pp 143-153, 2004.

HEINKENWALDER, M.; JULIUS, C.; AGUZZI, A. **Prion and peripheral nerves: A deadly rendezvous.** *Journal of Neuroscience Research*, vol. 85, pp. 2714-2725, 2007.

HOMMA, T.; IBARASHI, D.; NAKAGAKI, T.; FUSE, T.; MORI, T.; SATOH, K.; ATARASHI, R.; NISHIDA, N. **Ubiquitin-specific protease 14 modulates degradation of cellular prion protein.** *Scientific Reports*, vol. 5, pp. 1-10, 2015.

INOUE, S.; TSUJI, F.I. **Evidence for redox forms of the *Aequorea* green fluorescent protein.** FEBS Letters, vol. 351, no. 2, pp. 211-214, 1994.

IVASKA, J.; PALLARI, H.M.; NEVO, J.; ERIKSSON, J.E. **Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling.** Experimental Cell Research, vol. 313, pp. 2050-2062, 2007.

JOHNSTON, J.A.; WARD, C.L.; KOPITO, R.R. **Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins.** Journal of Cellular Biology, vol. 143, pp. 1883-1898, 1998.

KHMELINSKII, A.; MEURER, M.; HO, C.-T.; BESENBECK, B.; FÜLLER, J.; LEMBERG, M.K.; BUKAU, B.; MOGK, A.; KNOP, M. **Incomplete proteasomal degradation of green fluorescent proteins in the context of tandem fluorescent protein timers.** Molecular Biology of the Cell, vol. 27, no. 2, pp. 360-370, 2016.

KLYMKOWSKY, M.W. **Intermediate filaments in 3T3 cells collapse after intracellular injection on a monoclonal anti-intermediate filament antibody.** Nature, vol. 297, pp. 249-251, 1981.

KRISTIANSEN, M.; MESSENGER, M.J.; KLÖHN, P.-C.; BRANDNER, S.; WADSWORTH, J.D.F.; COLLINGE, J.; TABRIZI, S.J. **Disease-related Prion Protein Forms Aggresomes in Neuronal Cells Leading to Caspase Activation and Apoptosis.** The Journal of Biological Chemistry, vol. 280, no. 46, pp. 38851-38861, 2005.

LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, vol. 227, no. 5259, pp. 680-685, 1970.

LEE, K.S.; MAGALHÃES, A.C.; ZANATA, S.M.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R.; PRADO, M.A.M. **Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells.** Journal of Neurochemistry, vol. 79, pp. 79-87, 2001.

LIN, J.J.-C.; FERAMISCO, J.R. **Disruption of the in vivo distribution of the intermediate filaments in fibroblasts through the microinjection of a specific monoclonal antibody.** Cell, vol. 24, pp. 185-193, 1981.

LINDEN, R.; MARTINS, V.R.; PRADO, M.A.M.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I. BRENTANI, R.R. **Physiology of the prion protein.** Physiological Reviews, vol. 88, no. 2, pp. 673-728, 2008.

LOPES, M.H.; HAJJ, G.N.M.; MURAS, A.G.; MANCINI, G.L.; CASTRO, R.M.P.S.; RIBEIRO, K.C.B.; BRENTANI, R.R.; LINDEN, R.; MARTINS, V.R. **Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways.** The Journal of Neuroscience, vol. 25, no. 49, pp. 11330-11339, 2005.

MA, J.; WOLLMANN, R.; LINDQUIST, S. **Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol.** Science, vol. 298, no. 5599, pp. 1781-1785, 2002.

MACHADO, C.F.; BERALDO, F.H.; SANTOS, T.G.; BOURGEON, D.; LANDEMBERGER, M.C.; ROFFÉ, M.; MARTINS, V.R. **Disease-associated mutations in the prion protein impair laminin-induced process outgrowth and survival.** The Journal of Biological Chemistry, vol. 287, no. 52, pp. 43777-43788, 2012.

MARTINS, V.R.; BERALDO, F.H.; HAJJ, G.N.; LOPES, M.H.; LEE, K.S.; PRADO, M.M.; LINDEN, R. **Prion protein: orchestrating neurotrophic activities.** Current Issues in Molecular Biology, vol.12, no.2, pp. 63-86, 2010.

MASTRIANNI, J.A. **The genetics of prion diseases.** Genetics in Medicine, vol. 12, no. 4, pp. 187-195, 2010.

MAYER, R.J.; LOWE, J.; LENNOX, G.; DOHERTY, F.; LANDON, M. **Intermediate filaments and ubiquitin: a new thread in the understanding of chronic neurodegenerative diseases.** Progress in clinical and biological research, vol. 317, pp. 809-818, 1989.

MENDEZ, M.G.; KOJIMA, S.; GOLDMAN, R.D. **Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition.** The FASEB Journal, vol. 24, pp.1838-1851, 2010.

OESCH, B.; WESTAWAY, D.; WÄLCHLI, M.; MCKINLEY, M.P.; KENT, S.B.; AEBERSOLD, R.; BARRY, R.A.; TEMPST, P.; TEPLow, D.B.; HOOD, L.E. **A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein.** Cell, vol. 40, pp. 735-746, 1985.

PAN, K.-M.; BALDWIN, M.; NGUYEN, J.; GASSET, M.; SERBAN, A.; GROTH, D.; MEHLHORN, I.; HUANG, Z.; FLETTERICK, R.J.; COHEN, F.E. **Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 90, pp. 10962-10966, 1993.

PROVANSAL, M.; ROCHE, S.; PASTORE, M.; CASANOVA, D.; BELONDRADÉ, M.; ALAIS, S.; LEBLANC, P.; WINDL, O.; LEHMANN, S. **Proteomic consequences of expression and pathological conversion of the prion protein in inducible neuroblastoma N2a cells.** Prion, vol. 4, issue 4, pp. 292-301, 2010.

PRUSINER, S.B.; SCOTT, M.R.; DEARMOND, S.J.; COHEN, F.E. **Prion protein biology.** Cell, vol. 93, pp. 337-348, 1998.

RAMBOLD, A.S.; MIESBAUER, M.; RAPAPORT, D.; BARTKE, T.; BAIER, M.; WINKLHOFER, K.F.; TATZELT, J. **Association of Bcl-2 with misfolded prion protein is linked to the toxic potential of cytosolic PrP.** Molecular Biology of the Cell, vol. 17, no. 8, pp. 3356-3368, 2006.

RESTELLI, E.; FIORITI, L.; MANTOVANI, S.; AIRAGHI, S.; FORLONI, G.; CHIESA, R. **Cell type-specific neuroprotective activity of untranslocated prion protein.** Plos One, vol. 5, no. 10, pp. 1-9, 2010.

ROUCOU, X.; GUO, Q.; ZHANG, Y.; GOODYER, C.G.; LEBLANC, A.C. **Cytosolic prion protein is not toxic and protects against bax-mediated cell death in human primary neurons.** The Journal of Biological Chemistry, vol. 278, no. 42, pp. 40877-40881, 2003.

SCHROCK, Y.; SOLIS, G.P.; STUERMER, C.A.O. **Regulation of focal adhesion formation and filopodia extension by the cellular prion protein (PrP^C).** FEBS Letters, vol. 583, pp. 389-393, 2009.

SHAO, J.; CHOE, V.; CHENG, H.; TSAI, Y.C.; WEISSMAN, A.M.; LUO, S.; RAO, H. **Ubiquitin ligase gp78 targets unglycosylated prion protein PrP for ubiquitylation and degradation.** Plos One, vol. 9, no. 4, pp. 1-7, 2014.

SHIGYO, M.; KUBOYAMA, T.; SAWAI, Y.; TADA-UMEZAKI, M.; TOHDA, C. **Extracellular vimentin interacts with insulin-like growth factor 1 receptor to promote axonal growth.** Scientific Reports, vol. 5, no. 12055, pp. 1-13, 2015.

TRINDADE, E.S. et al. **Marcações para microscopia**, In: Oliveira Ribeiro, Ciro A. ; Reis Filho ; Grötzner, Sonia Regina. (Org.). Técnicas e Métodos para Utilização Prática de Microscopia. Rio de Janeiro: GEN - Grupo Editorial Nacional, Editora Santos, pp. 187-236, 2012.

VIDAIR, C.A.; HUANG, R.N.; DOXEY, S.J. **Heat shock causes protein aggregation and reduced protein solubility at the centrosome and other cytoplasmic locations.** International Journal of Hyperthermia, vol. 12, pp. 681-695, 1996.

WIERTZ, E.J.; JONES, T.R.; SUN, L.; BOGYO, M.; GEUZE, H.J.; PLOEGH, H.L. **The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol.** Cell, vol. 84, pp. 769-779, 1996.

YEDIDIA, Y.; HORONCHIK, L.; TZABAN, S.; YANAI, A.; TARABOULOS, A. **Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein.** The EMBO Journal, vol. 20, no. 19, pp. 5383-5391, 2001.

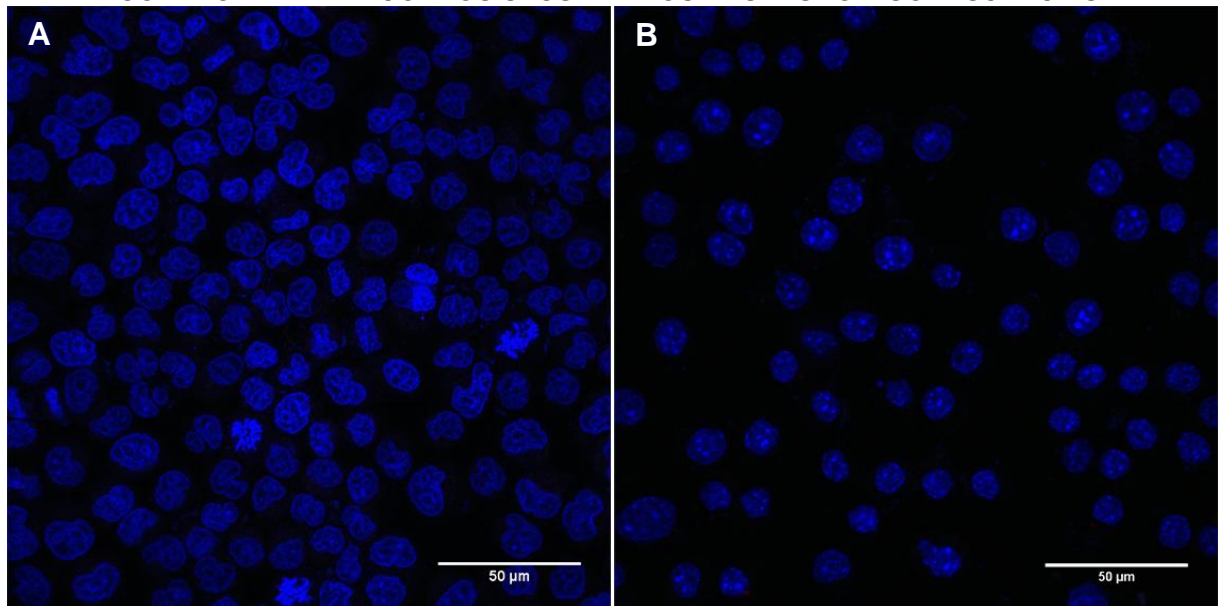
ZAFAR, S.; ASIF, A.R.; RAMLJAK, S.; TAHIR, W.; SCHMITZ, M.; ZERR, I. **Anchorless 23-230 PrP^C interactomics for elucidation of PrP^C protective role.** Molecular Neurobiology, DOI 10.1007/s12035-013-8616-2, 2014.

ZAFAR, S.; von AHSEN, N.; OELLERICH, M.; ZERR, I.; SCHULZ-SCHAEFFER, W.J.; ARMSTRONG, V.W.; ASIF, A.R. **Proteomics approach to identify the interaction partners of cellular prion protein and characterization of Rab7a interaction in neuronal cells.** Journal of Proteomics Research, vol. 10, pp. 3123-3135, 2011.

ZANATA, S.M.; LOPES, M.H.; MERCADANTE, A.F.; HAJJ, G.N.M.; CHIARINI, L.B.; NOMIZO, R.; FREITAS, A.R.O.; CABRAL, A.L.B.; LEE, K.S.; JULIANO, M.A.; **Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection.** EMBO Journal, vol. 21, pp. 3307-3316, 2002.

APÊNDICE 1

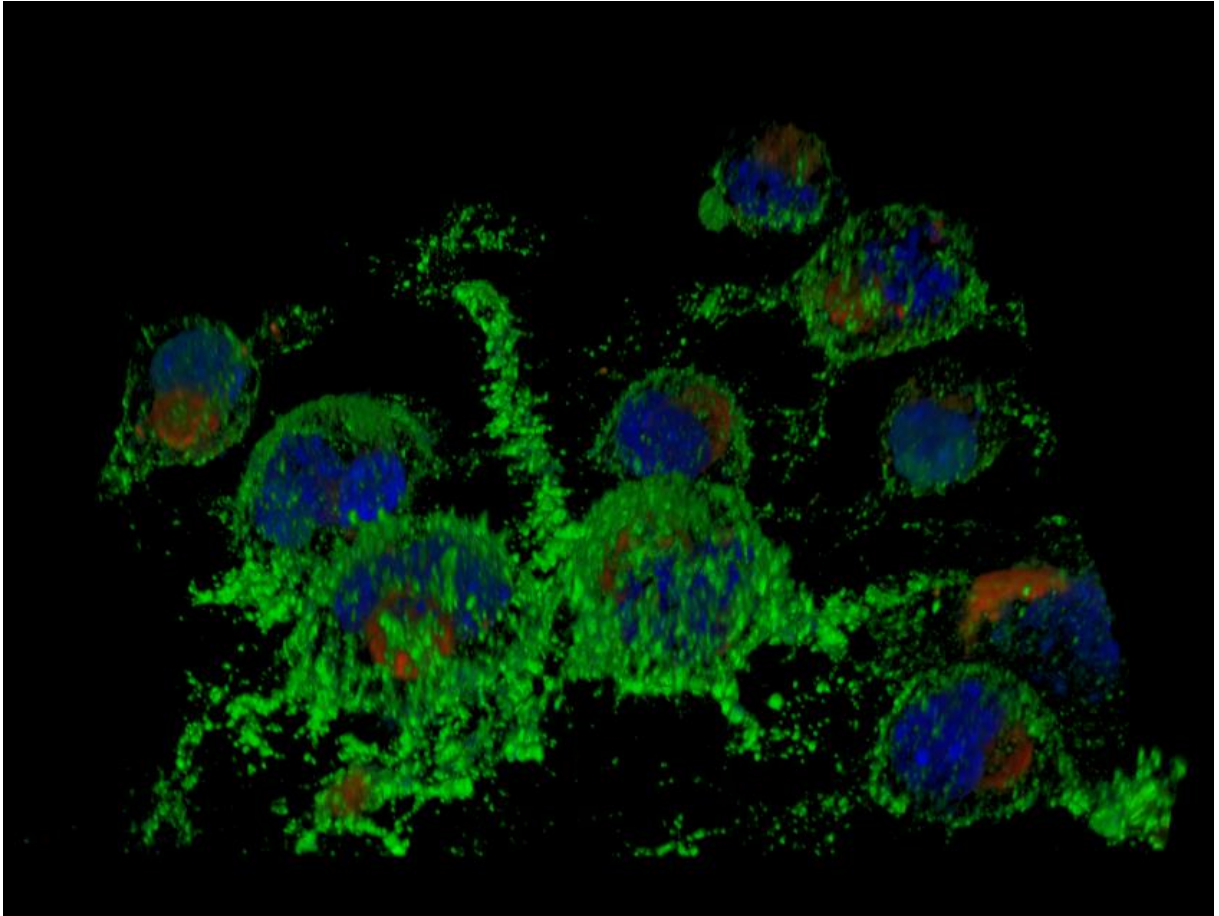
CONTROLE DE ANTICORPOS SECUNDÁRIOS DAS IMUNOFLUORESCÊNCIAS.



Controle dos anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Texas Red ou ao fluoróforo Alexa 647 e anti-IgG de camundongo conjugado ao fluoróforo Alexa 488 para as células HeLa (A) e células N2a (B). FONTE: O autor (2017).

APÊNDICE 2

MODELO 3D DE AGRESSOMOS.



Modelo de visualização volumétrica da imunofluorescência das células N2a sem transfecção tratadas com MG132. PrP^C é marcado em verde, vimentina em vermelho e o núcleo em azul com DAPI. Os agressomos podem ser vistos como uma esfera dentro das células e próximas de seus núcleos, obrigando PrP dentro de sua cavidade. FONTE: O autor (2017).